



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

*EFFECTO DEL ENTRENAMIENTO INCREMENTADO EN TRES MODELOS
DE MALNUTRICIÓN (CRÓNICA, PRENATAL Y POSNATAL) EN UNA
TAREA DE TIPO ESPACIAL EN RATAS ADULTAS*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA

PATRICIA DE LA ROSA SANTANDER

DIRECTORA DE TESIS

DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA

Campus Juriquilla, Mayo 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del Comité tutor certificamos que la tesis elaborada por: Patricia de la Rosa Santander, cuyo título es: Efecto del entrenamiento incrementado en tres modelos de malnutrición (crónica, prenatal y posnatal) en una tarea de tipo espacial en ratas adultas, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. León F. Cintra McGlone †

Dra. Gina Lorena Quirarte

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Patricia de la Rosa Santander, cuyo título es: Efecto del entrenamiento incrementado en tres modelos de malnutrición (crónica, prenatal y posnatal) en una tarea de tipo espacial en ratas adultas, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Jurado de examen

Presidente	Dr. Manuel Salas Alvarado	_____
Secretario	(Tutora) Dra. Sofía Y. Díaz Miranda	_____
Vocal	Dra. Carolina Escobar Briones	_____
Suplente	Dra. Gina Lorena Quirarte	_____
Suplente	Dr. Víctor Ramírez Amaya	_____

Aprobado por el Comité Académico

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Neuromorfometría y Desarrollo, así como en el laboratorio de Aprendizaje y Memoria del Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Deseo expresar mi reconocimiento y agradecimiento a las siguientes instituciones y personas, por el apoyo brindado para su realización.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto No: 102500.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM), por la beca otorgada a través de los Proyectos PAPIIT-DGAPA, UNAM IN202809 e IN216708.

Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), por la Beca Mujeres “Rosalind Franklin” No. de Becario: BM-080510164725.

Laboratorio Neuromorfometría y Desarrollo, Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. A la M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez por su asesoría y apoyo técnico. A la Lic. en Psic. Tonantzin Pineda Martínez por su apoyo técnico. Al M. en C. Vicente Beltrán Campos por su asesoría en el análisis estadístico de los datos, y a todos mis compañeros del laboratorio.

Laboratorio de Aprendizaje y Memoria, Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. A la M. en C. Norma Serafín López por su asistencia técnica en el laboratorio.

Bioterio, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. Al MVZ. Martín García por su gran trabajo y paciencia y esmero en el cuidado de los animales del bioterio y por los datos de pesos de ratas gestantes controles presentados en esta tesis.

Biblioteca, Instituto de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM. Al MVZ. Román Pacheco Barrita por estar siempre dispuesto a ayudar a los alumnos, por recibirme siempre con una enorme sonrisa al entrar a la biblioteca

A la Dra. Sofía Y. Díaz Miranda con admiración y respeto, por su invaluable apoyo, paciencia y asesoría.

A mi Comité Tutor formado por los Drs. León Federico Cintra McGlone †, Manuel Salas Alvarado y la Dra. Gina Lorena Quirarte por sus valiosos comentarios que hicieron posible el enriquecimiento del presente trabajo.

Los Drs. Miembros del Jurado: Drs. Manuel Salas Alvarado, Carolina Escobar Briones, Gina Lorena Quirarte, Víctor Ramírez Amaya, por sus acertados comentarios.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico por su enorme disposición y apoyo en los trámites realizados en la maestría.

ÍNDICE	
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Malnutrición	3
2.2 Alteración del metabolismo por la malnutrición	5
2.3. Efecto de la malnutrición perinatal	6
2.4. Malnutrición y daño oxidativo	8
2.5. Malnutrición y desarrollo del sistema nervioso	9
2.6 Malnutrición en el hipocampo	10
2.7 Sobreentrenamiento y plasticidad de las FM en los tres modelos de malnutrición	12
2.8 Aprendizaje y memoria	13
2.8.1 Plasticidad sináptica en el hipocampo producida por la experiencia	14
2.9 Aprendizaje incrementado (sobreentrenamiento)	15
2.10 Aprendizaje y malnutrición	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	19
5.1 Generales	19
5.1.1 Particulares	19
6. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO	20
6.1 Malnutrición con dieta isocalórica hipoproteínica del 6% de caseína	20
6.2 Composición de las dietas	21
6.3 Grupos experimentales	23
6.4 Protocolo conductual (laberinto acuático de Morris)	24
6.5 Prueba espacial	25
6.6 Pruebas estadísticas	26

7 RESULTADOS	27
7.1 Malnutrición en las madres	27
7.2 Observaciones cualitativas de los neonatos y obtención de F2 y F3	27
7.3 Resultados cuantitativos del peso corporal al momento del nacimiento	28
7.3.1 Peso cerebral y hepático al momento del nacimiento (P0)	29
7.3.2 Índice de los pesos cerebra y hepático con relación al peso corporal (P0)	30
7.3.3 Pesos corporales al momento del destete (P23)	31
7.3.4 Pesos corporales despues de las pruebas conductuales (P110)	31
7.3.5 Índices del peso del hígado y del cerebro entre El peso corporal después de las pruebas conductuales (P110)	33
7.4 Resultados de la prueba conductual LAM.	35
7.4.1. Promedios de tiempo en segundos para adquirir el aprendizaje MPre, MPos y MCro, comparados con el grupo Con cada día	38
8. DISCUSIÓN	39
9 CONCLUSIONES	45
10 BIBLIOGRAFÍA	46
11. LISTA DE FIGURAS	52

RESUMEN

La malnutrición (M) perinatal potencialmente es un factor oxidativo que altera el metabolismo (Kleiber et al., 2010) con repercusiones en la tasa de crecimiento corporal y efectos adversos sobre funciones cerebrales como el aprendizaje. Se sabe que éste es favorecido por el sobreentrenamiento en tareas espaciales. En este trabajo se produjo M (con solo un 6 % de caseína en la dieta) durante tres periodos pre y posnatal, M crónica (MCro); solo en el posnatal (MPos) o en el prenatal (MPre). Se analizó el peso corporal de las gestantes, así como en las crías al nacer (P0), al destete (P23) y en la edad adulta (P110). Se obtuvo el índice del peso del hígado (órgano regulador del metabolismo) y del cerebro de las crías en P0 y en P110, después de la prueba conductual, en donde se utilizaron 10 machos Sprague-Dawley por cada grupo (MPre, MPos, MCro y control). Desde P90 los animales se entrenaron en el laberinto acuático de Morris durante 6 días (8 ensayos/día) y en cada uno se midió la latencia de escape hacia la plataforma oculta. La M redujo el peso corporal de las gestantes y el de las crías y en P110 la disminución fue del 70%; y del 40% y 18% del cerebro y del hígado, respectivamente. También se redujo en 20% la tasa de crecimiento. En todos los grupos con M el sobreentrenamiento favoreció la adquisición de la tarea. Los datos sugieren que en los tres modelos de M, es posible una adaptación, porque pudieron adquirir la tarea. Pero, la M en la gestación tuvo un impacto en el desarrollo somatotópico desde el feto hasta el adulto, manifestados por el bajo peso y alteraciones fisiológicas que pueden repercutir en áreas cerebrales más susceptibles como aquellas que rigen las funciones motoras y cognitivas.

ABSTRACT

Prenatal malnutrition (M) potentially is an oxidative factor that alters the metabolism (Kleiber et al., 2010) with an impact on the rate of body growth and adverse effects on brain functions such as learning. It is known that this is favored by the overtraining in spatial tasks. In this work, M was induced (with only 6% of casein in the diet) in three periods of time: pre- and post-natal care, chronic M (MCro); only in the post-natal care (MPos); or in the pre-natal period (MPre). We analyzed the body weight of the pregnant rats, as well as in the offspring at birth (P0), at weaning (P23) and in adulthood (P110). Indexes of the weight of the liver (regulator organ of metabolism) and of the brain of pups in P0 and P110 were obtained after the behavioral test, where 8 male Sprague-Dawley rats per group (MCro, MPos, MPre and control) were used. Starting P90, animals were trained in the Morris water maze during 6 days (8 trials / day) and the latency of escape toward the hidden platform was measured for each rat. M diminished mother and pups body weights which decreased 70% at P110, and 40% and 18% of brain and liver weights, respectively. In addition, the growth rate diminished 20%. In all the M groups, task acquisition was favored by overtraining. The data suggests that adaptation is possible in the three models of M because all of them were able to acquire the task. But, gestational M had impact on body development from fetus stage to adulthood, manifested in low weight and physiological alterations that may affect more susceptible brain areas such as those regulating motor and cognitive functions.

1. INTRODUCCIÓN

La alimentación juega un papel preponderante en la vida de los organismos, el retraso en el crecimiento y desarrollo físico debido a la malnutrición es una realidad para los países poco desarrollados técnicamente en el mundo (Gómez et al., 1956). Se advierte en la estatura corporal casi universalmente más pequeña sea cuales fueren sus antecedentes genéticos (Scrimshaw, 1968). Se sabe que la malnutrición en el periodo perinatal es un factor oxidativo potencial que altera el metabolismo glucídico y lipídico (Kleiber y cols., 2010) con repercusiones en la tasa de crecimiento corporal y efectos adversos sobre funciones cerebrales como el aprendizaje espacial. La malnutrición, es un tipo de nutrición inadecuada en la cual la alimentación es insuficiente por estar ausente un nutrimento específico (por ejemplo la proteína). Esta dieta puede afectar severamente al cerebro cuando se establece en periodos críticos de su desarrollo. En ratas recién nacidas trae como consecuencia la reducción de peso del cerebro, retraso en la mielinización, alteraciones en las neuronas corticales y una disminución en terminales axonales en la corteza. Se ha reportado que la malnutrición altera el tamaño de las fibras musgosas del hipocampo, así como el número de sus conexiones (Cintra et al., 1997a, b). Por otro lado, se sabe que el entrenamiento incrementado en la tarea de evitación inhibitoria genera un efecto protector para la consolidación de la memoria, aún cuando al sujeto se le han administrado drogas que producen deficiencias significativas en la consolidación (Prado-Alcalá y Quirarte, 2007). En un estudio realizado por Ramírez-Amaya et al., 1999, se encontró que el sobreentrenamiento (más de 3 sesiones de entrenamiento) en el laberinto acuático de Morris (LAM) genera incremento de las proyecciones de las fibras musgosas del *stratum oriens*, en la subregión de CA3 del hipocampo, efecto que no se observó en los grupos control (aquellos que nadaron sin plataforma). Se ha considerado que el incremento de las proyecciones de las fibras musgosas, la ejecución y el desempeño durante la tarea están correlacionados y dicha correlación podría ser entre la sinaptogénesis y la formación de la memoria espacial. Otra propuesta es que las fibras musgosas modulan la actividad de las células de CA3 en donde los eventos plásticos podrían estar permitiendo la codificación de la información (Ramírez-Amaya et al., 2001).

Estas alteraciones morfológicas se relacionan con un desarrollo deficiente que impacta en la conducta (Salas et al., 1974). También se ha demostrado que la malnutrición influye en el desarrollo normal del individuo, y que esos efectos son dependientes del momento en que es instalada (Cintra et al., 1997a), que repercute en el desempeño adecuado de pruebas conductuales como es la adquisición de una tarea de tipo espacial que se altera por la malnutrición proteínica prenatal, pero que se revierte con una rehabilitación dietética al momento del nacimiento (Lukoyanov y Andrade, 2000). Además, la desnutrición proteica impuesta desde edades tempranas de la vida de las ratas puede producir trastornos en la memoria de trabajo, en el desempeño de una tarea espacial, como el laberinto acuático de Morris (LAM) y en la memoria de reconocimiento que persisten en la vida adulta (Valadares et al., 2010).

En la presente tesis, se llevó a cabo un estudio comparativo del efecto de la malnutrición (M) en ratas Sprague-Dawley, utilizando una dieta hipoproteínica en las etapas críticas del desarrollo: un modelo donde la M se instaló durante la gestación y las crías fueron rehabilitadas nutrimentalmente durante la lactancia (MPre); otro de crías malnutridas durante la lactancia o modelo posnatal (MPos) y otro en donde la M se instaló en ambos periodos, pre y posnatal o crónico (MCro). Éstos se compararon con un grupo control (Con) bien nutrido pre y posnatalmente. En los cuatro grupos adultos machos se entrenaron en el LAM (versión de plataforma oculta) y se midió el aprendizaje y la retención de tipo espacial, y la hipótesis propuesta consistió en saber si un entrenamiento conductual incrementado pudiera revertir el efecto de la M en el adulto. Además, se analizaron los pesos corporales, cerebrales y del hígado. Los resultados indicaron que los grupos MPos y MCro requirieron de más sesiones de entrenamiento para aprender la tarea y ninguno de los tres grupos, presentaron retención en el primer ensayo en cada uno de los 6 días de la prueba. Lo que sugiere la posibilidad de una adaptación del individuo, según el grado de M que le permite adquirir el aprendizaje espacial, solo que requiere de mayor experiencia. Pero, la M instalada desde la gestación tuvo un impacto mayor en el desarrollo corporal desde el feto hasta el adulto, que mostraron bajo peso y alteraciones fisiológicas que pueden repercutir en las áreas cerebrales que regulan las funciones motoras y cognitivas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Malnutrición

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, el término malnutrición se refiere al desequilibrio en la ingesta de energía, proteínas y otros nutrientes (De la Mata, 2008). Un individuo se encuentra malnutrido si su dieta no lo provee de calorías y proteínas adecuadas para su crecimiento y mantenimiento, o si es incapaz de utilizar por completo el alimento que consume debido a una enfermedad, o si consume demasiadas calorías. La desnutrición se diferencia de la malnutrición en que es el resultado de una ingesta de alimentos que es, de forma continuada, insuficiente para satisfacer las necesidades de energía alimentaria, de una absorción deficiente y/o de un uso biológico deficiente de los nutrientes consumidos. En todo el mundo la malnutrición, ya sea por carencias o excesos afecta a la mayor parte de la población. En los países en vías de desarrollo el principal problema es la desnutrición, asociada a la pobreza (Salomons y Gross, 1995). En México la desnutrición energético-proteínica, sigue siendo un problema de salud pública. De acuerdo a la Secretaría de Salud (SSA) en 2005, este tipo de desnutrición causó la muerte de 8,440 adultos y 590 niños menores de un año de edad. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT, 2006) 472,890 niños menores de 5 años de edad, en nuestro país, presentan bajo peso, 194,805 baja talla y alrededor de 153,000 niños presentan emaciación (signo característico de desnutrición).

La malnutrición experimental en roedores, puede lograrse utilizando una dieta baja en proteína (6% de caseína), reportándose en esos casos desde disminución de la talla, peso corporal y cerebral hasta alteraciones celulares en diferentes áreas cerebrales, al compararlos con sus testigos (Morgane et al., 1993). Desde los estudios de Guthrie y Brown (1968) en animales malnutridos (alimentados con 8% de proteína y comparados con los controles (alimentados con 18% de proteína) en diferentes edades después del nacimiento y rehabilitados nutrimentalmente, mostraron que, la curva de pesos corporales comenzó a nivelarse a la misma edad aproximadamente (16 a 18 semanas), sin importar el peso que habían alcanzado. Esto sugirió que aunque los animales privados de alimento en forma temprana podrían continuar creciendo lentamente, nunca compensarían por completo la deficiencia del peso corporal

resultante de la malnutrición en una etapa temprana. Estos hallazgos se asocian al bajo peso en los órganos intracavitarios como el hígado (principal regulador del metabolismo corporal). Por lo que ahora se toma en cuenta el concepto de que el origen de las enfermedades de los adultos puede remontarse a la vida perinatal (Kleiber et al., 2010).

Se han diseñado diversos modelos de malnutrición experimental; destacando aquel en donde se conserva tanto la estimulación sensorial ambiental como la materna, por lo que sólo se reduce la cantidad de caseína (proteína de gran importancia en la dieta del neonato por contener 20 de los 21 aminoácidos esenciales y encontrarse en la leche materna). Esta dieta hipoproteínica, contiene solo el 6% de caseína, pero es isocalórica y se considera que provoca graves consecuencias al organismo (Morgane, et al., 1993) y dependiendo del tiempo en el que se instale produce disminución de la talla y pesos corporal y cerebral (Granados et al., 2004). Así, bajo este paradigma se estudian los efectos diferenciales ocurridos durante las diversas etapas del desarrollo del SNC instalados durante periodos críticos, tanto pre como postnatales, y se relacionan con el desarrollo de funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria (Bonatto et al., 2005). En un trabajo realizado por hacinamiento de animales que fueron alimentados en camadas de 20 crías por madre, y entrenados después del destete en la tarea de prevención activa a los 2 meses de edad, Leathwood et al., (1973) observaron que aquellos animales malnutridos aprendieron de manera significativa más lentamente que los animales control. En un segundo experimento se les administró un tratamiento de rehabilitación nutricional a los 2, 4 y 6 meses de edad y no se encontró mejoría en el desempeño de esta prueba en animales malnutridos y rehabilitados. En 1974, Bush y Leathwood observaron que los animales malnutridos en el periodo posnatal mostraban un desempeño significativamente menor en comparación con animales control en una tarea de prevención activa. La malnutrición posnatal produce efectos a largo plazo, en tanto que en la prenatal se pueden corregir decrementos de peso y talla en relación a la edad (Díaz-Cintra et al., 1991, 2007). Esta aparente mejoría no se refleja totalmente en el desarrollo de estructuras cerebrales como el cuerpo calloso anterior, que conecta con áreas frontales a través de la línea media (Olivares et al., 2001).

2. 2. Alteración del metabolismo por la malnutrición

Estudios epidemiológicos muestran una alta relación entre el bajo peso al nacimiento por restricción intrauterina y los desórdenes metabólicos en el estado adulto. La malnutrición durante los periodos críticos del desarrollo (gestación y lactancia) reduce el peso corporal y cerebral, modifica el metabolismo a corto y largo plazo y produce, alteración en la tolerancia a la glucosa y deficiencia en la función pancreática. La rehabilitación nutricional no revierte los efectos, lo que indica una alteración metabólica permanente en el adulto (Miñana-Solis & Escobar, 2008). El concepto de centros metabólicos programados sobre la idea del estado nutricional y hormonal, determina el control a largo plazo del balance energético, en la conducta alimentaria y la disposición de energía (Coupé, et al, 2009). Varias líneas de evidencia indican que durante el período perinatal del desarrollo, la restricción nutricional sensibiliza a la descendencia para el desarrollo de la obesidad, resistencia a la insulina, y las enfermedades cardiovasculares en la edad adulta. Por otra parte, se ha investigado si la desnutrición perinatal afecta a los ritmos circadianos y la expresión de genes que regulan la ingesta en el hipotálamo y el metabolismo de energía en el hígado. Para estos estudios, se han alimentado ratas gestantes y durante la lactancia *ad libitum* con dietas baja en proteína (8% de proteína). En el momento del destete, las crías se alimentan con una dieta estándar hasta los 17 y 35 días de edad. Los patrones diarios de expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real indican que en los animales de 17-días de edad que fueron expuestos a la desnutrición perinatal presentan alteraciones significativas en el ritmo circadiano del perfil de expresión de las transcripciones y codificación de diversos genes que regulan la ingesta de alimentos, las enzimas metabólicas así como los genes del reloj “*bmal1*”. Estos efectos persisten después del destete, asociados a una hiperfagia. Por lo tanto, las ratas desnutridas perinatalmente presentan un aumento de la expresión hipotalámica de péptidos y proteínas relacionadas con el neuropéptido Y. Estas observaciones indican que el reloj circadiano se altera en su programación para la dieta, y que puede contribuir a las alteraciones en la alimentación y el metabolismo de energía asociada a la malnutrición al comienzo de la vida; con lo cual podría promover el desarrollo de trastornos metabólicos en la edad adulta (Orozco-Solís et al., 2010). Se ha planteado la hipótesis

de que la exposición neonatal de elementos prooxidantes exacerbaban la generación de peróxidos, afectando a la sangre y los triglicéridos del plasma en neonatos, se pueden además alterar los niveles de glicemia, la tolerancia a la glucosa hepática y la actividad enzimática de la glucocinasa o la fosfructocinasa (enzimas claves de glucólisis), y acetil-CoA carboxilasa (enzima clave de lipogénesis). En el estudio de Kleiber et al. (2010) concluyen que la exposición neonatal de moléculas antioxidantes tales como peróxidos tiene consecuencias importantes más tarde en la vida, se altera el metabolismo glucídico y lipídico que conducen a un fenotipo de deficiencia energética asociado a una menor cantidad de triglicéridos en plasma, baja actividad de la fosfructocinasa; menor tolerancia a la glucosa, menor peso corporal, y actividad física. Por otra parte, se sabe que la glutamina y la prolina se metabolizan en el hígado y pueden colaborar en su regeneración, así cuando éstas se suministran en ratas sin hígado o desnutridas, se mejora el RNA total contenido en el tejido hepático remanente (Passos et al., 2010).

La desnutrición materna (embarazo y/o la lactancia) por restricción del 50% de la dieta, afecta al crecimiento y desarrollo del feto, se ha investigado si se altera de manera permanente el crecimiento del corazón, riñón, pulmón y cerebro. A partir de 10 días de gestación y a través de 21 días la lactancia. Si los órganos fueron disecados y pesados (porcentaje del peso corporal) en edades entre 3 semanas y 9 meses, aunque el peso corporal sea mayor en la edad adulta, hay sin embargo, disminución del peso del corazón, riñón, pulmón y cerebro en comparación con los controles. Habiendo una diferencia por género, así, los animales machos, mostraron relativamente menor peso en los hígados, mientras que las hembras mostraron relativamente pequeñas glándulas suprarrenales. Estas diferencias sexo-dependientes, que pueden producir cambios permanentes en crecimiento relativo del corazón y los riñones pueden aumentar el riesgo de las enfermedades de los adultos (Desai et al., 2005).

2.3. Efecto de la malnutrición perinatal

La malnutrición crónica y postnatal reducen de manera importante la talla y los pesos, corporal y cerebral de los animales adultos (Granados et al., 2004). Por el contrario, la rehabilitación nutricional al momento del nacimiento, no muestra diferencias

significativas en la talla y los pesos corporal y cerebral, como se muestra en la Figura 2. Sin embargo, las alteraciones que ocurren en el sustrato neuronal, de manera importante en la corteza y el hipocampo, se muestran como relevantes reducciones en la distribución de ramas y espinas dendríticas, así como el tamaño celular, en estudios de morfometría neuronal, Díaz Cintra et al. (1981, 1984, 1990, 1991, 2007) reportaron que los animales malnutridos de manera crónica mostraban reducciones de las espinas dendríticas o de ramas. Otros autores reportaron reducciones del número de neuronas de los campos CA3 y CA1 del hipocampo (Andrade et al, 1991; Lukaoyanov 2000) y de las sinapsis entre las fibras musgosas y el campo CA3 (Granados et al, 2002). La malnutrición, incrementa la neurogénesis del giro dentado del hipocampo (Nuñez et al, 2000) y altera el sistema de fibras musgosas (Andrade et al., 1996; Andrade y Paula-Barbosa, 1996) dependiendo del tipo de malnutrición. Por otra parte, los estudios electrofisiológicos reportan disminución en las posdescargas y la propagación de crisis (Bronzino et al., 1999, Kehoe et al., 2001) a la vez que el cerebro del malnutrido es susceptible a las crisis convulsivas (Palencia et al., 1996). Los estudios de neuroquímica, han reportado reducciones de las enzimas glutámico descarboxilasa (GAD) y colin acetiltransferasa (Andrade et al, 1996) y alteraciones en la producción de neurotransmisores y sus receptores (5-HT₂ y 3), i.e. se incrementan las concentraciones de triptófano, precursor de la serotonina o entre la relación serotoninérgica y el GABA y se ha mostrado que agonistas a 5-HT y GABA causan disfunción en la retención del aprendizaje en el primer ensayo a las 24 horas después mientras que los antagonistas la mejoran (Farr et al., 2000). También se ha reportado una mayor activación del sistema inhibitorio de animales malnutridos prenatalmente (Mokler et al, 2003; 2007). Además, la malnutrición en distintos períodos de desarrollo del hipocampo produce efectos nocivos sobre la población de neuronas GABA del hipocampo dorsal. Debido quizás, a que el programa de muerte celular se retrasa y que altera de manera diferente el desarrollo en todo el hipocampo. Afectando así la excitabilidad celular, la respuesta emocional, la motivación, y las alteraciones de memoria que presentan las ratas malnutridas (Díaz Cintra et al., 2007). Asociado a una deficiencia en la memoria de navegación espacial y los niveles del BDNF en el

hipocampo que pudiera contribuir a la deficiencia en las pruebas de memoria y aprendizaje (Wang y Xu., 2007).

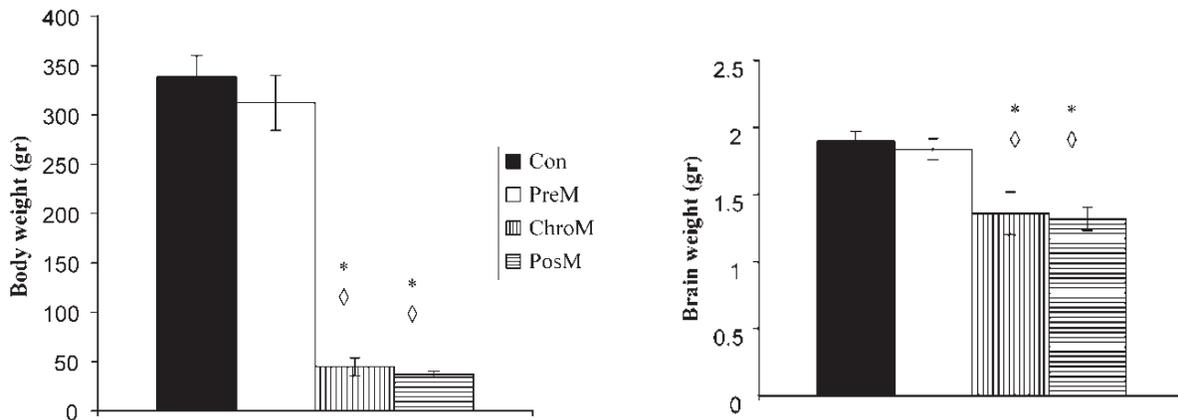


Figura 1. Pesos corporales y cerebrales en tres modelos de malnutrición. La rehabilitación nutricional (PreM) recupera los pesos corporal y cerebral, no así la malnutrición posnatal (PosM) y crónica (ChroM) de animales de 70 días de edad. Nótese, la diferencia de los pesos corporales de más del 70% y del 25% en el peso cerebral (Modificado de Granados et al., 2007).

2.4. Malnutrición y daño oxidativo cerebral

La malnutrición proteínica aumenta el daño oxidativo de lípidos y proteínas en el SNC (Feoli et al., 2006) y en la médula espinal de ratas recién nacidas con MPre (Tatli et al., 2007) así como astrocitosis producida por MPre, asociada a la alteración extracelular regulada por la activación de la cinasas (Feoli et al., 2006). El cerebro, después del tejido adiposo, es el órgano más rico en lípidos y ácidos grasos poliinsaturados, por lo que los estudios se enfocan a las reacciones mediadas por especies de oxígeno reactivas, particularmente de lípidos neuronales, extensivas en aquellas áreas del cerebro directamente involucradas en el proceso de la memoria, de ahí que para dilucidar su papel con respecto al deterioro funcional cerebral, los lípidos de la dieta han sido objeto de diferentes estudios relacionados con el estrés oxidativo. Datos recientes sugieren que la lipoperoxidación es un evento temprano en el deterioro cognitivo ligero. De ahí que se plantea que las sustancias antioxidantes como las vitaminas E, C, carotenos, polifenoles pueden reducir el daño neuronal y la inhibición

producida por las reacciones oxidativas por inhibición de generación de especies reactivas de oxígeno, peroxidación lipídica, apoptosis, oxidación de proteínas; daño a las membranas celulares o DNA (Domínguez, 2009). Se ha estudiado, en el periodo perinatal, el daño inducido por estrés oxidativo en las membranas neuronales de manera indirecta por la lipoperoxidación en aquellas estructuras que llevan a cabo diferentes funciones motoras y cognitivas (corteza, estriado, cerebelo e hipocampo). Los resultados indican alteraciones diferenciales de la lipoperoxidación que fueron estadísticamente diferentes para cada grupo de experimentación y en las cuatro estructuras cerebrales estudiadas (Maldonado-Cedillo, 2011).

2.5. Malnutrición y desarrollo del sistema nervioso

La malnutrición durante el desarrollo produce efectos importantes en el sistema nervioso central (SNC) y en sus mecanismos celulares, que son regulados durante los periodos críticos a lo largo de todo el desarrollo. Estos incluyen división celular (neurogénesis y gliogénesis), migración celular a las áreas blanco del cerebro, diferenciación celular (arborización dendrítica, extensiones axonales, formación de circuitos), mielinización, sinaptogénesis, síntesis y liberación de neurotransmisores, angiogénesis y muerte celular programada (apoptosis). Estos procesos no se presentan al mismo tiempo (heterocronía), porque siguen un patrón distinto de manifestación, siendo diferente para cada especie. La mayoría de éstos se inician en la etapa prenatal y se extienden más allá del nacimiento, aunque algunos comienzan durante el periodo postnatal, por lo que pueden ser alterados fácilmente por estímulos tanto exógenos (v.gr. malnutrición, drogas o alcohol), como endógenos (v.gr. las hormonas). Esta vulnerabilidad neuronal temporal ha sido denominada por Kretchmer (1989), como periodos críticos del desarrollo neuronal. Así, los factores epigenéticos como la malnutrición, el estrés o el uso de drogas durante el desarrollo intrauterino o en periodos perinatales (críticos) repercuten en defectos neuronales en áreas cerebrales vulnerables (como la neocorteza o el hipocampo) produciendo trastornos que van desde la alteración del ciclo celular hasta la integración funcional a lo largo de todo el periodo de vida (para revisión ver Morgane et al., 1993).

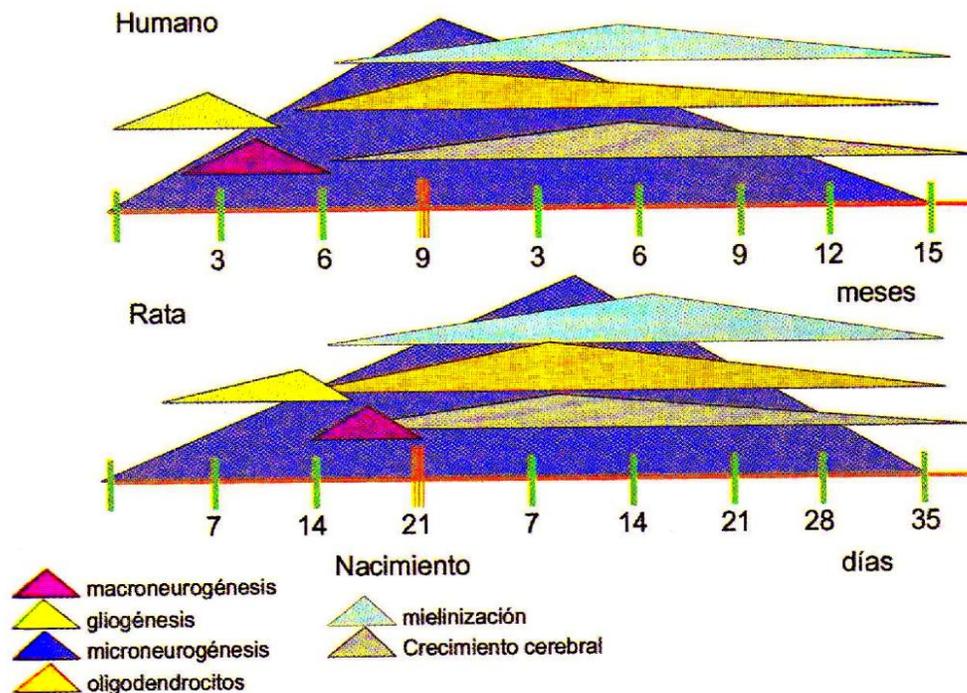


Figura 2. Períodos críticos del desarrollo. Procesos neuronales que participan en la formación del tejido neuronal, en meses en el hombre y en días en la rata. Nótese que la microneurogénesis, es un proceso continuo hasta los 15 meses y 35 días, respectivamente. La macroneurogénesis y la gliogénesis, se inician tempranamente antes de los 65 meses y 21 días, respectivamente. Los procesos de formación de los oligodendrocitos y de la mielinización van casi al parejo del crecimiento cerebral, entre los 7-15 meses y entre los 14 a los 35 días en el hombre y rata, respectivamente (modificado de Morgane et al., 1993).

2.6. Malnutrición en el hipocampo

Con referencia a las alteraciones neuronales por deficiencia de la proteína durante el desarrollo, los efectos son mayores si la malnutrición es instalada durante los periodos críticos del desarrollo del sistema nervioso en general y del hipocampo en particular. Estudios previos indican efectos diferenciales cuando la malnutrición es iniciada durante el periodo prenatal (Pre), o el posnatal (Pos) o en ambos (Cro). Los modelos de malnutrición así generados se clasifican en: 1) malnutrición crónica (MCro), cuando la dieta deficiente se administra a lo largo de toda la vida del individuo desde etapas tan tempranas como la gestación; 2) malnutrición prenatal (MPre), si solamente se malnutre a la madre durante la gestación y las crías al parto son intercambiadas a una

madre nodriza bien nutrida (modelo de rehabilitación nutricional desde el momento del nacimiento); y 3) la malnutrición postnatal (MPos), cuando se administra a partir del parto (este modelo es el más drástico debido a que afecta el desarrollo postnatal del sistema nervioso y en particular del hipocampo).

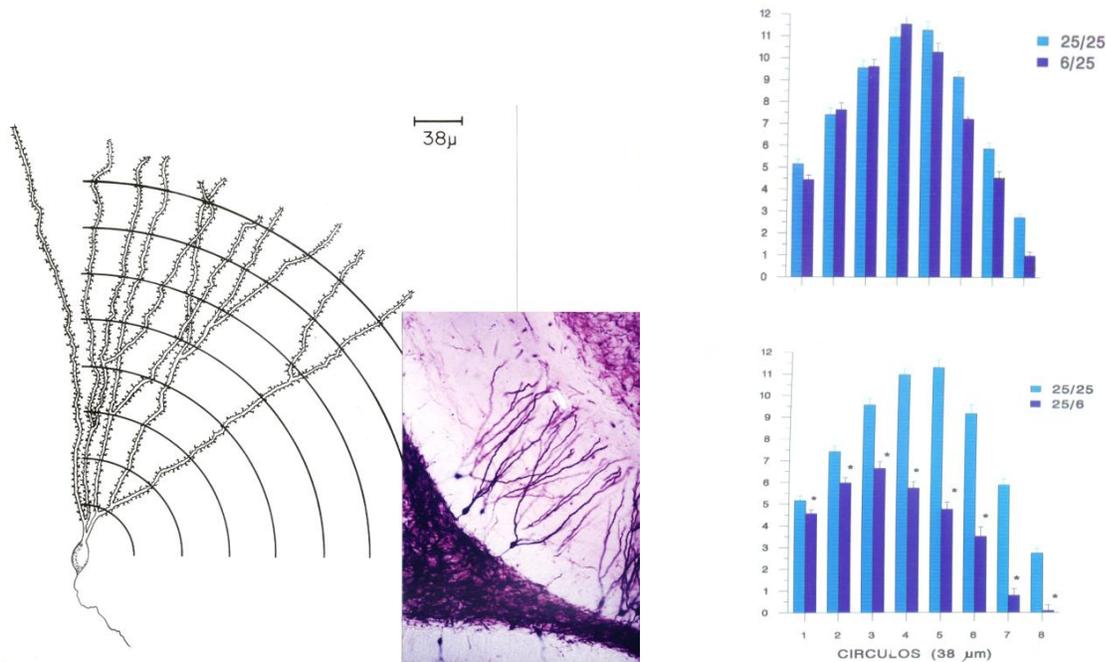


Figura 3. Células granulares del giro dentado del hipocampo. A la izquierda, un dibujo de una célula granular (cámara lucida) y los círculos concéntricos para la medición de la densidad dendrítica por el cruce en cada uno de ellos de las dendritas (método de Sholl), a un lado una fotomicrografía del giro dentado con las células granulares impregnadas con la técnica de Golgi. Las gráficas indican la densidad de las dendritas de los grupos malnutridos: 6/25, o MPre en donde no hubo reducción del árbol dendrítico, y abajo, el grupo malnutrido posnatalmente MPos o 25/6 comparados con los grupos control o bien nutridos (25/25) que mostraron una reducción significativa del árbol dendrítico, en cada uno de los 8 círculos concéntricos en estos animales (MPos) o 25/6. Esquema modificado de Díaz-Cintra et al., 1997.

En estos modelos de malnutrición se ha mostrado que se producen cambios en la arquitectura dendrítica (Díaz-Cintra et al., 1990; 1997), Figura 4, y densidad sináptica del hipocampo, (Granados; 2002) y a la vez hay deficiencias funcionales en tareas sensoriales y motoras que involucran procesos cognitivos dependientes de esta estructura. Por observaciones previas se sabe que el desarrollo general del sistema nervioso de los animales sometidos a la malnutrición, presenta alteraciones y retardos en los procesos de maduración, diferenciación y reconocimiento sináptico.

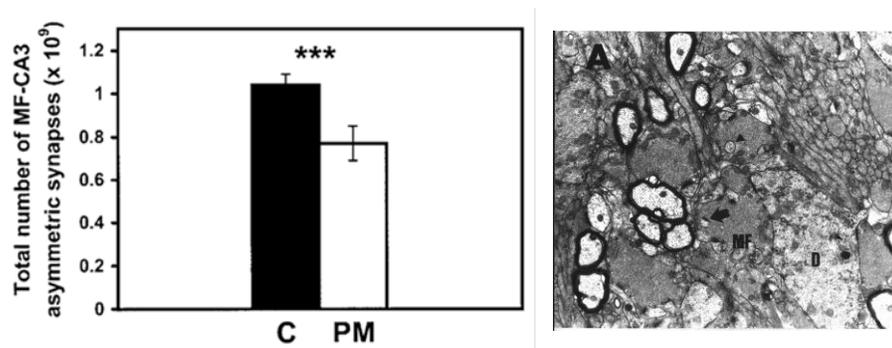


Figura 4. Número total de sinapsis asimétricas (excitatorias) entre la fibra musgosa y las dendritas de las células piramidales del CA3 y una imagen de microscopia electrónica en donde se hicieron las mediciones de los grupos control (C) y malnutridos posnatales (PM). Nótese la disminución significativa del número de sinapsis (modificado de Granados et al., 2002).

2.7 Sobreentrenamiento y plasticidad de las FM en los tres modelos de malnutrición

En el caso del sobreentrenamiento por tareas de tipo espacial, se observa un crecimiento de axones en el estrato oriens de las células piramidales del CA3. Por lo que se asume una respuesta plástica producto de esta en el hipocampo, que es el sitio en donde principalmente se integra la memoria de tipo espacial (Moser y Moser, 1998), porque responde con cambios plásticos sinápticos después de una experiencia de aprendizaje de este tipo (Rusakov, et al., 1997a). La mayor parte de estas alteraciones se asocian de manera directa a deficiencias anatómicas en el hipocampo y los cambios se encuentran principalmente en el metabolismo o bien en la duración de los procesos del desarrollo celular. Una característica anatomo-funcional del hipocampo, es que sus células principales responden de manera plástica a estímulos del medio ambiente, elaborando nuevos contactos sinápticos (sinaptogénesis) por crecimiento de los axones y de los sitios posinápticos (espinas).

2.8. Aprendizaje y memoria

El aprendizaje y la memoria son mecanismos importantes de adaptación a las condiciones ambientales complejas y cambiantes. Como consecuencia de los procesos de aprendizaje y memoria, los animales modifican su conducta con base en la

experiencia (Almaguer-Melián y Bergado-Rosado, 2002). La representación entre objetos y eventos es flexible, es decir, puede ser modificada.

Existen diversos conceptos de aprendizaje, la mayoría de ellos coinciden en que es el proceso en el cual se modifica la conducta a partir de una experiencia determinada. Este cambio no es explicado con fundamento en las tendencias innatas de respuesta, en la maduración o en los estados transitorios del organismo como la fatiga, las drogas y la enfermedad (Aguado-Aguilar, 2001), este cambio es relativamente permanente.

El aprendizaje se puede agrupar en dos tipos principales: aprendizaje asociativo, el cual depende de que el cambio conductual se deba a la experiencia repetida de dos eventos que aparecen relacionados con el tiempo; y el aprendizaje no asociativo implica experiencia con un solo estímulo o con dos estímulos que no tienen necesariamente una relación temporal que depende de la simple repetición de un único evento.

La memoria se define como el proceso de reorganización de datos almacenados uso y mantenimiento transitorio de la información (Aguado-Aguilar, 2001). En el proceso de aprendizaje y memoria intervienen las siguientes fases: 1) adquisición, siendo esta fase la primera confrontación con una experiencia, 2) consolidación, la cual consiste en el almacenamiento de la información y conlleva a modificaciones en el sistema nervioso, 3) evocación, es la recuperación de la información y 4) extinción, en la cual se va reduciendo la magnitud de la respuesta (Prado-Alcalá, 1991).

Además, para facilitar el estudio de este proceso tan complejo como es el almacenamiento de la información, se ha clasificado la memoria en: 1) memoria de procedimiento, también es llamada memoria de trabajo, se valora cuando el sujeto aprende a realizar una actividad y posteriormente se le pide que realice dicha actividad. 2) memoria declarativa, la cual incluye todos los conocimientos que pueden ser potencialmente manifestados a través de palabras como una imagen mental; esta memoria puede ser de tipo semántica la que se refiere al conocimiento del mundo y episódica que se refiere a los datos autobiográficos.

La memoria espacial consiste en la relación espacio temporal hecha por un organismo para ubicarse en un determinado lugar por medio de claves espaciales que le permitan hallarse en dicho espacio, es un tipo de memoria episódica y por lo tanto forma parte de la memoria declarativa (Squire y Zola, 1996). En los roedores, el hipocampo es el sitio en donde se integra la memoria de tipo espacial (Moser y Moser, 1998) porque responde con cambios plásticos sinápticos después de una experiencia de aprendizaje de este tipo (Rusakov, et al.; 1997b), y los paradigmas usados para investigar la participación de esta estructura en el aprendizaje y la memoria espacial son los laberintos de agua y radial (Crusio y Schwegler, 2005). Utilizando el paradigma del laberinto acuático de Morris, Ramírez-Amaya et al., (1999), encontraron que cuando se sometían a los sujetos de experimentación a un entrenamiento incrementado, este se reflejaba en un cambio anatómico en el hipocampo dorsal.

2.8.1. Plasticidad sináptica en el hipocampo producida por la experiencia

La plasticidad en el sistema nervioso en general y en el hipocampo en particular, puede ser funcional o estructural y ser el resultado de diferentes experiencias. Las respuestas a estas experiencias, se define por una parte como plasticidad reactiva que es relativa a estímulos biológicamente significativos que tienen lugar en un corto periodo de tiempo, y producen cambios metabólicos ante un aumento de oxígeno, estímulos nociceptivos y otros. Por otra parte, la plasticidad adaptativa aparece ante estímulos constantes y demandas ambientales que producen cambios como la potenciación a largo plazo (LTP), o bien modificaciones en la cantidad de receptores, en el número de dendritas o de espinas dendríticas y hasta la neurogénesis en el adulto. Además, la plasticidad reparativa que ocurre ante lesiones en el sistema nervioso que producen reorganización de circuitos dañados. Por esta capacidad, existen una amplia variedad de estudios experimentales que han demostrado que diferentes aprendizajes promueven la aparición de nuevas sinapsis; por ejemplo se sabe que el aprendizaje de una tarea acrobática (motora) estimula la sinaptogénesis en la corteza motora (Kleim et al., 1996). Este tipo de evidencia ha permitido que en la actualidad se acepte el concepto de que los cambios plásticos en la comunicación entre neuronas pueden ser el sustrato de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria, y recientemente

el hipocampo ha sido una estructura que ha demostrado presentar cambios plásticos tanto funcionales como estructurales en respuesta al aprendizaje y la memoria de tareas específicas (Isaacson, 2002; Balderas et al, 2004; Wang, y Xu., 2007).

2.9. Aprendizaje incrementado (sobreentrenamiento)

Este aprendizaje es el condicionamiento mediado por un número de ensayos o de sesiones de entrenamiento mayor que los que normalmente se aplican para alcanzar cierto nivel de aprendizaje (Prado-Alcalá y Quirarte, 2005). Además induce espinogénesis en las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo, en el estudio de Garín-Aguilar et al. (2012) se muestra que los animales que habían sido estimulados con un alta intensidad de choque (3,0 mA) presentan mayor resistencia a la extinción y este efecto se relaciona con un incremento significativo en el número de espinas dendríticas en el CA1 del hipocampo dorsal. Está bien documentado en la literatura que el entrenamiento incrementado juega un papel protector de la consolidación de la memoria como en la evitación pasiva, administrando fármacos amnésicos en diferentes estructuras involucradas en la memoria como el hipocampo (Quiroz y cols., 2003). En el estudio realizado por León-Jacinto (2008), se comprobó que el aprendizaje de la tarea en el laberinto acuático de Morris facilitó el aprendizaje de otra tarea espacial (el laberinto radial), asociado a un cambio morfológico en el número, tipo y distribución de espinas dendríticas en el CA3 del hipocampo dorsal, proponiendo que las modificaciones estructurales asociadas a la experiencia espacial contribuyen a mejorar la adquisición de otros aprendizajes espaciales. Además los animales fueron sometidos a la prueba del laberinto acuático de Morris durante 5 días con el propósito de comprobar los efectos del aprendizaje incrementado que redujo de manera importante el tiempo como se muestra en la Figura 4. Se ha propuesto que la información puede almacenarse mediante cambios en la comunicación sináptica (Bliss y Collingridge, 1993). Santiago Ramón y Cajal propuso una teoría sobre el almacenamiento de la información y postula que la información se almacena en el cerebro mediante cambios anatómicos entre la conexiones de las neuronas (Bailey et al; 2000); siendo el primero en proponer la plasticidad en el número y fuerza de las conexiones neuronales como la base física del aprendizaje y el soporte de la memoria. Adicionalmente, Sherrington en

1906 propuso el término plasticidad sináptica para describir los cambios en las propiedades funcionales de una sinapsis como resultado de su actividad (Bailey et al., 2000; Burke, 2007).

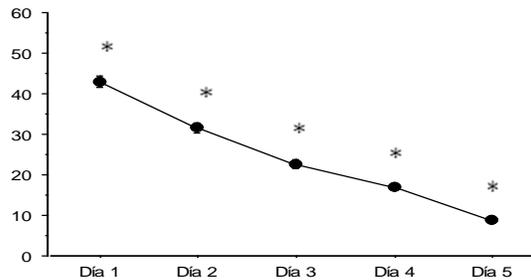


Figura 5. Ejecución en el laberinto acuático de Morris. Se representa el promedio de la latencia para encontrar la plataforma (60 segundos máximo), en 5 días (10 ensayos por sesión) de entrenamiento. Considerándose sobreentrenamiento a partir del tercer día. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las sesiones indicando que los animales aprendieron bien la tarea (Modificado de León-Jacinto, 2008).

2.10. Aprendizaje y malnutrición

Se sabe que el hipocampo es fundamental para el aprendizaje y la memoria, pero además es una estructura sensible a factores estresantes durante el desarrollo prenatal, como la malnutrición que produce alteraciones anatómicas de las células piramidales del hipocampo, así como un deterioro en el aprendizaje espacial. Si la malnutrición se instala desde el momento del nacimiento y se mantiene durante toda la vida, el cerebro de los animales seniles malnutridos puede adaptarse a mecanismos compensatorios que reducen los efectos de la malnutrición. Sin embargo, persisten efectos anatómicos y funcionales del hipocampo que impiden el mantenimiento de la memoria a largo plazo (Martínez et al., 2009). La malnutrición posnatal instaurada en etapas tempranas produce deficiencias en el desarrollo de habilidades para resolver tareas de discriminación espacial condicionada (Castro et al., 1989) y en el aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (LAM) en diferentes edades (35, 65, 170 y 200 días). Bedi (1992) reportó solo diferencias significativas en los animales de 35 días de edad, ya que después de un corto periodo de rehabilitación nutricional se

eliminaron las diferencias entre los controles y los grupos previamente malnutridos sin importar la edad ni el grado de malnutrición. Fukuda, et al., (2002), encontraron que la malnutrición postnatal, aumenta las latencias para encontrar la plataforma oculta en el LAM en animales malnutridos, a pesar de recibir un tratamiento de rehabilitación nutrimental.

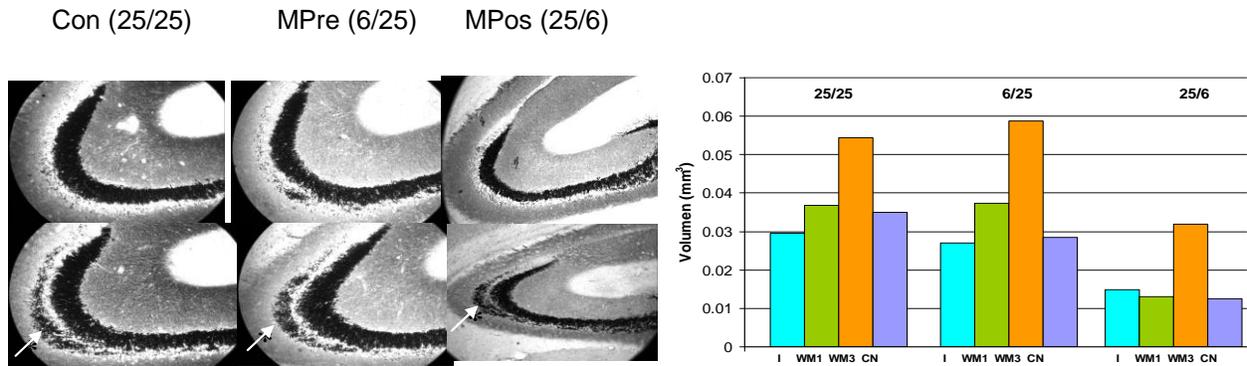


Figura 6. Fotomicrografías y gráficas del área de las fibras musgosas (FM) en el CA3 del hipocampo. Se indica con una flecha el crecimiento de las FM producto del sobreentrenamiento en el LAM en los grupos control (25/25) y malnutridos pre MPre (6/25) y Pos (26/6)). Las gráficas indican los 4 grupos I, intacto sin entrenamiento (I) y control de nado (CN) y con entrenamiento de uno (WM1) y tres (WM3) días o sobreentrenamiento, en los 3 grupos experimentales. Nótese, el aumento del área por el sobreentrenamiento en cada condición experimental, pero además en el grupo malnutrido posnatal (MPos o 25/6) se redujeron las áreas de manera proporcional (Díaz Cintra et al., en preparación).

Estudios previos conductuales de sobreentrenamiento asociado al crecimiento de las fibras musgosas (FM) del hipocampo, no mostraron diferencias los animales malnutridos durante el periodo prenatal y rehabilitados al momento del nacimiento no así los animales malnutridos crónicamente (periodos pre y posnatal), en donde el volumen del hipocampo y del área de las FM se redujo de manera significativa, Figura 6.

3. JUSTIFICACION

La malnutrición (M) experimental, produce deficiencias en el crecimiento que reducen la talla y el peso corporal (PC). Se sabe que la M perinatal es un factor oxidativo potencial que altera el metabolismo (Kleiber et al., 2010) con repercusiones en la tasa de crecimiento corporal, en la masa muscular y el peso de los órganos periféricos como el hígado, páncreas y las glándulas suprarrenales que se reducen en mayor proporción que el peso cerebral. A la fecha los estudios publicados de animales con M prenatal y rehabilitación nutrimental (RN) al momento del nacimiento (MPre), recuperan la talla y los pesos corporal y cerebral. Pero las alteraciones en el sustrato neuroanatómico (corteza e hipocampo), permanecen a largo plazo. La M crónica (MCro) durante los periodos pre y posnatal, o solo durante el periodo posnatal (MPos) provoca reducción de la talla y los pesos corporal y cerebral, aunque en la primera se conserva cierta proporción con el peso de los órganos viscerales. En el cerebro, dependiendo del periodo del desarrollo en el que se instale la M los efectos pueden permanecer a largo plazo aún y cuando exista una RN durante la lactancia, debido a los periodos críticos en donde las diferentes áreas cerebrales son más vulnerables. Así, los modelos de M (MPre, MCro y MPos), cada uno provocará distintas alteraciones durante el desarrollo cerebral. Se ha reportado, que una dieta baja en proteína (6% de caseína) afecta el sustrato anatómico que integra los procesos cognitivos que dependen de éste. Además, los animales M en etapas tempranas perinatales, presentan deficiencias en el desarrollo de habilidades para resolver tareas de discriminación espacial condicionada, aun después de haber sido RN. Así, es importante explorar si los retardos en el desarrollo observados en éstos 3 modelos se pueden extrapolar al tipo de respuesta conductual en especial a su desempeño en tareas que involucren la adquisición y la retención de nuevas conductas, en comparación con animales con una dieta balanceada y si los efectos pudieran revertirse con un aprendizaje incrementado, dado que estudios previos en animales normales, indican que si son sometidos a un sobre entrenamiento de pruebas conductuales de memoria espacial, adquieren mejor el aprendizaje. Habría que ver si esto ocurre en los animales malnutridos o si requieren un mayor tiempo de entrenamiento para lograrlo.

4. HIPÓTESIS

- La malnutrición MPre, afectará los pesos corporales, del hígado y del cerebro.
- La malnutrición MPos, afectará los pesos corporales, del hígado y del cerebro.
- La malnutrición MCro, afectará los pesos corporales, del hígado y del cerebro.
- Los efectos de la malnutrición MPre, sobre el aprendizaje de tipo espacial se verán compensados por el sobreentrenamiento.
- Los efectos de la malnutrición MPos, sobre el aprendizaje de tipo espacial se verán compensados por el sobreentrenamiento.
- Los efectos de la malnutrición MCro, sobre el aprendizaje de tipo espacial se verán compensados por el sobreentrenamiento.
- La retención durante el sobreentrenamiento de tipo espacial se verá afectada de manera diferencial entre los grupos MPre, MPos y MCro.

5. OBJETIVOS

5.1. Generales

- Implementar los modelos de malnutrición (M) hipoproteínica (6% de caseína) e isocalórica en tres periodos del desarrollo (prenatal, Pre; posnatal Pos; y crónico Cro).
- Medir la adquisición y la retención de tipo espacial en el laberinto acuático de Morris (LAM) en los tres modelos de malnutrición y en el grupo control.

5.1.1. Particulares

- Valorar cualitativamente parámetros somatotópicos del retardo en el desarrollo en los tres modelos de malnutrición al momento del nacimiento.
- Medir el peso corporal, hepático y cerebral en animales en periodos críticos del desarrollo (P0 y P23) y en adultos (P110) de los tres modelos de malnutrición.
- Determinar el índice de los pesos corporales hepático y cerebral en P0, P23 y P110 en los tres modelos de malnutrición.
- Determinar el tiempo de aprendizaje de los animales adultos control.
- Determinar si las ratas malnutridas aprenden con 2, 5 y/o 6 sesiones de entrenamiento con 8 ensayos en cada sesión del LAM.

6. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO

El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la obtención de las camadas, se utilizaron 70 ratas de la variedad Sprague Dawley, hembras primíparas entre 200 y 250 gramos alojadas 3 ratas por caja (de policarbonato, 24x21x45 cm), con ciclo de luz/oscuridad invertido de 12 h (luces encendidas a las 10 horas) y con agua y alimento *ad libitum* (condición de socialización). Fueron alimentadas con dos tipos de dieta: una dieta estándar que contiene 23.4% de caseína (control) del laboratorio Purina Chow (Formula 5001), y otra de 6% de caseína (Harlan Teklad, Madison, WI; Formula TD 92090), para producir la malnutrición (ver Tabla 1). Con libre acceso al agua y alimento y en condiciones óptimas de bioterio a una temperatura de 21°C y de humedad relativa al 50% en un cuarto sonoamortiguado. El grupo control se mantuvo con la dieta normal de laboratorio (código 5001) durante los periodos pre y postnatal. Se obtuvieron y mantuvieron las camadas en las mismas condiciones, y se utilizaron solo los machos alojados de 2 a 3 individuos por caja hasta formar los diversos grupos experimentales.

6. 1. Malnutrición con dieta isocalórica e hipoproteínica del 6% de caseína

La malnutrición se produjo 4 semanas antes del apareamiento, se formaron dos grupos cada uno de 35 ratas, para el programa de la conducta que requería condiciones similares para los 4 grupos experimentales (cada uno de 10 animales). A estas ratas se les sometió al régimen de malnutrición con una dieta isocalórica e hipoproteínica del 6% de caseína (Harlan Teklad Co, USA, Madison, WI; Formula TD 92090, de importación), con la finalidad de que su metabolismo corporal se estabilizará (Tabla I). Se les monitoreó el peso corporal cada tercer día y en la 5ª semana, se introdujo un macho (por caja con 3 hembras) para el apareamiento. El 1er día de gestación se determinó por la observación del tapón vaginal, separándose las hembras preñadas (19/35 = al 63%) en cajas individuales durante todo el periodo de gestación, tomando el peso corporal cada semana. El día el parto, las crías nacidas de madres malnutridas, se pesaron individualmente, y separaron por sexo, de manera aleatoria se ajustó la camada solo con 8 crías procurando que las camadas nacidas en el mismo día, fueran

mezcladas y asignadas a diferentes madres malnutridas (MCro). Para producir los modelos de MPre y MPos, de manera simultánea, se monitoreo el mismo número de ratas control, para que al momento de los nacimientos se pudieran intercambiar las camadas. Así, una madre control, adoptó la camada de una madre malnutrida (MPre) y ésta la camada del control (MPos). Se continuó cada 3er día con las observaciones físicas cualitativas de las crías malnutridas: apertura de los oídos y ojos (palpebral) y además en las hembras la apertura vaginal. Todas las crías se destetaron en el día P23 y se colocaron 3 animales del mismo sexo en cada caja (24x21x45 cm) con la misma dieta, hasta los días posnatales 90 (P90) edad en la que se formaron 4 grupos para la prueba conductual. Al término de los experimentos, se sacrificaron todos los animales, con la finalidad de un estudio posterior anatómico comparativo de tipo estereológico, para valorar la plasticidad del hipocampo dorsal en relación al crecimiento de las fibras musgosas asociado al entrenamiento incrementado.

6.2. Composición de las dietas

En general se acepta que la estructura y función del cerebro están influenciadas por la dieta (Ahmed, et al., 1987; Cintra 1997a; Fukuda et al., 2002; Bonatto 2005; Coupé 2009). Los constituyentes de la dieta (macro y micronutrientes), tienen influencia en la estructura y función del cerebro. Se sabe que el cerebro adulto consume el 50 % de los carbohidratos de la dieta y el 80% de ellos con fines energéticos. La naturaleza de la composición amino acídica de las proteínas de la dieta contribuye a un buen funcionamiento cerebral (Bourre, 2004a, b).

Este diseño permite valorar el daño que produce la malnutrición postnatal por carencia de la proteína principal de la leche materna (caseína) durante los periodos críticos del desarrollo, sobre todo en los procesos de maduración del SNC y en el establecimiento de sus funciones (Morgane, Mockler & Galler, 2002).

La Tabla 1, muestra la información nutrimental de la dieta para roedores. Los nutrientes y el porcentaje de dieta para roedores. Dieta estándar con 23.4% de proteína (Lab Rodent Diet 5001 PMFeeds, Inc) y dieta baja en proteína (6% de caseína). Nótese que los nutrientes como los carbohidratos y lípidos son similares en ambas dietas

Tabla 1. Tabla comparativa de los componentes de los dos tipos de alimento

Dieta Estandar - 23.4% de proteína <i>Lab Rodent Diet 5001 PM1 Feeds, Inc.</i>		Dieta Hipoproteínica - 6% de proteína <i>Tekland Diet 170916</i>	
COMPONENTES	%	COMPONENTES	%
Caseína	23.49	Caseína	6.00
L-Metionina	0.67	L-Metionina	0.37
Grasa cruda	10.00	Grasa cruda	15.18
Minerales	2.50	Minerales	3.50
Kcal/g	4.07	Kcal/g	4.30



Figura 7. Fotografías de camadas de rata control y malnutrida. A la izquierda una rata control y a la derecha una rata malnutrida (dieta azul con 6% de caseína), nótese el tamaño de los sujetos malnutridas.



Figura 8. Fotografías de los tres modelos de malnutrición al destete. Nótese la diferencia de talla de los grupos malnutridos. En A, comparados con el animal control (Con). En B, el animal MPos, presenta la mayor reducción de la talla y en C, entre el MPre y el MPos.

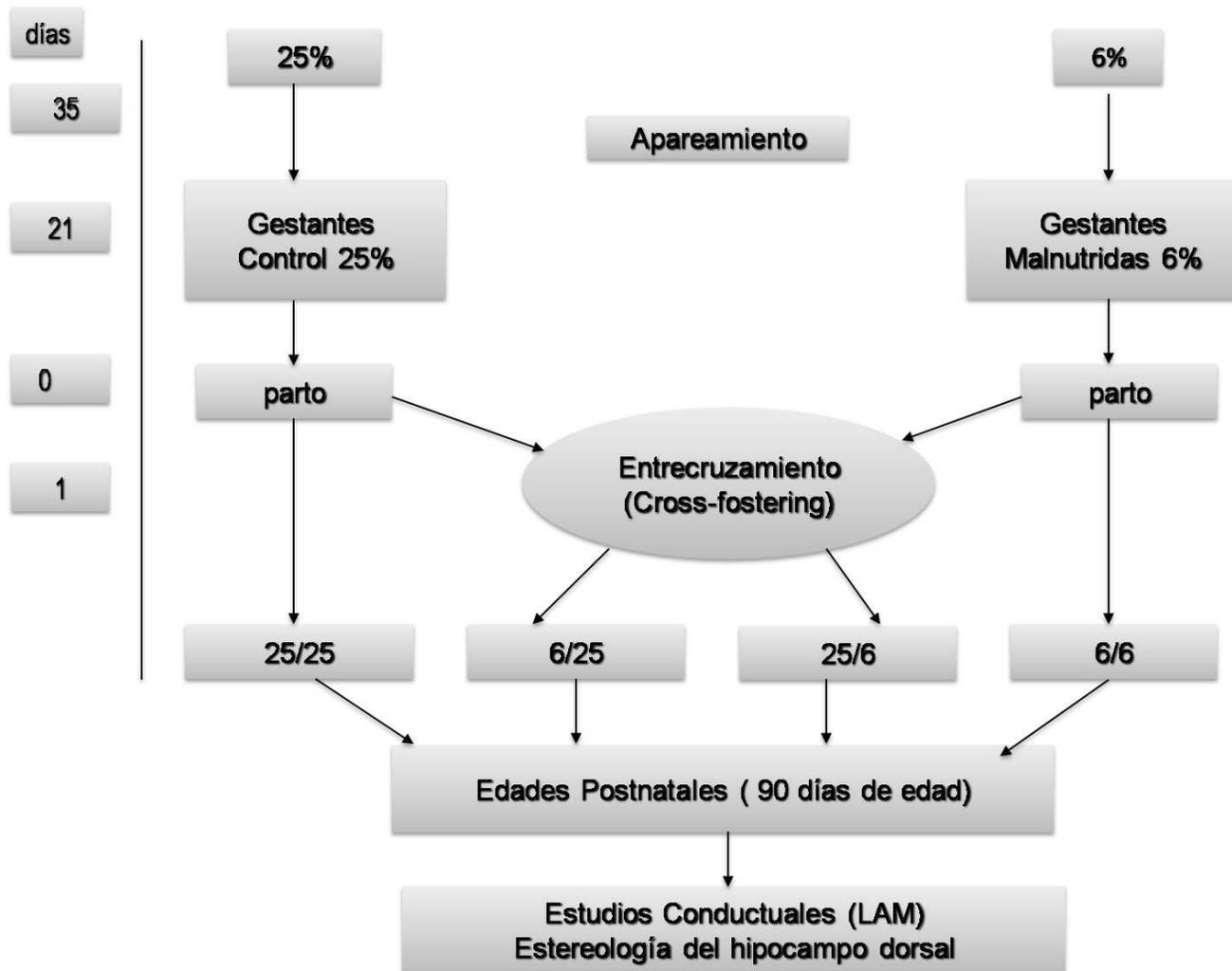
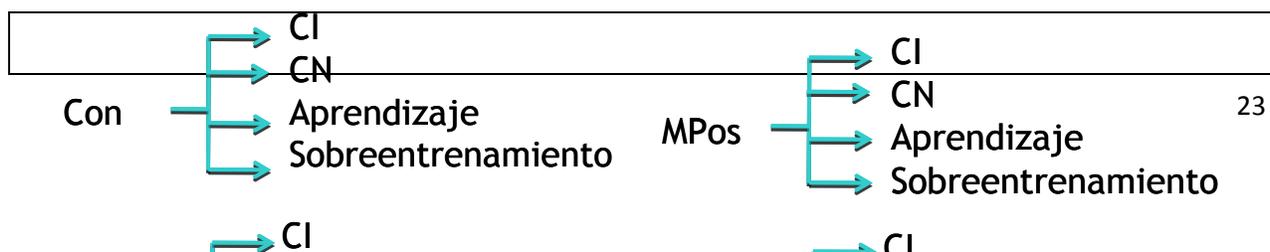


Figura 9. Esquema del protocolo de malnutrición. Se indican los días (35) del régimen nutricional para las madres: los días de gestación (21), al momento del nacimiento días cero (0), el primer día de intercambio o entrecruzamiento de las camadas para producir los modelos de malnutrición. Se indican con 25 la dieta normal (con 21.3% de caseína), y con 6 la dieta isocalórica e hipoproteínica del 6% (MCro) de caseína; 25/25 (Con) indica el grupo control alimentado pre y posnatalmente con dieta normal; 6/25 (MPre) alimentados prenatalmente y rehabilitados al momento del nacimiento. El estudio conductual se llevó a cabo a los 90 días en el laberinto acuático de Morris (LAM), versión plataforma oculta. Los órganos se extrajeron después de concluída la prueba conductual (P110) y el encéfalo se reservó para un estudio posterior de esterología del hipocampo dorsal.

6.3. Grupos experimentales

Se formaron 16 grupos cada uno con 10 animales de cada condición experimental bien nutridos o grupo control (Con) y los tres grupos malnutridos (MPre; MPos y MCro).





- El grupo control intacto (CI), permaneció en el bioterio y sirvió para las comparaciones de peso con los grupos malnutridos y anatómicas para estudios posteriores.
- El grupo control para nado (CN) fueron animales que nadaron en el laberinto acuático sin plataforma y durante un tiempo equivalente en que los animales sobreentrenados encontraban la plataforma.
- El grupo entrenado en el laberinto acuático, se sometieron tres sesiones cada uno de 8 ensayos.
- El grupo sobreentrenado, se sometieron durante 6 sesiones al laberinto acuático.

6.4. Protocolo conductual (laberinto acuático de Morris)

El laberinto acuático de Morris (LAM) fue diseñado por el Profesor Richard Morris hace casi 30 años. Sigue siendo popular para medir pruebas de aprendizaje y memoria. Las ratas y ratones, son nadadores naturales por lo que nadar es parte de su repertorio conductual y por ello, este dispositivo tiene dos ventajas, el animal quiere salir, por lo que busca la salida guiándose por pistas visuales externas, y en el agua no hay aromas. Así el dispositivo permite valorar la memoria de tipo espacial que consiste de un tanque redondo con nivel de agua de 50-80 cm y una plataforma oculta a 1.5 cm por debajo del nivel del agua. La temperatura del agua debe ser de 26° C \pm 2°C grados, para evitar el frío que favorece el escape, pero que puede provocar hipotermia, lo que impide aprender.

El laberinto utilizado en el presente experimento, consistió de un tanque circular negro de plástico con diámetro de 150 cm y una altura de 60 cm, colocado sobre una

base de metal que lo sostiene a una altura de 58 cm del piso. El nivel del agua de 30 cm y una temperatura de $25^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$, colocado en un cuarto sonoamortiguado, pintado de blanco con dimensiones de 236 cm x 225 cm x 242 cm en cuyas paredes se colocan carteles como pistas visuales, Figura 10.

6.5. Prueba espacial

Los experimentos se analizaron con un sistema de video (SMART, San Diego Instruments) con el que se registraron los recorridos y la latencia de llegada a la plataforma. Los animales se sometieron a cinco sesiones de 8 ensayos. En cada ensayo, el animal fue colocado dentro del tanque mirando de frente al muro en uno de los puntos designados aleatoriamente para el inicio: norte, sur, este, oeste (N, S, E, O); el animal pudo escapar del agua encontrando y subiéndose a la plataforma de escape. Cada ensayo duró 60 segundos y cuando algún animal no encontró la plataforma en ese tiempo, fue guiado manualmente hacia ella. Después de subirse a la plataforma, se les permitió a las ratas permanecer en ella durante 30 segundos y después fueron retiradas, secadas y colocadas en una caja seca de recuperación dimensiones, por un intervalo de 30 segundos, para posteriormente iniciar con el ensayo siguiente. La latencia (tiempo en segundos) de llegada a la plataforma de escape fue usada como una medida de adquisición según el procedimiento empleado por Brandeis et al. (1989) y Nerad et al. (1996). Se sabe que cada animal aprende a localizar la plataforma guiándose por las pistas en sólo un día, no obstante, su ejecución continúa mejorando hasta el quinto día (Ramírez-Amaya et al., 2001). La medida de extinción se le define como el decremento progresivo en la frecuencia de la respuesta condicionada que no ha sido reforzada, es un indicador de estas pruebas de aprendizaje y memoria, así la resistencia a la extinción es mayor cuando la experiencia has sido mayor (Galindo et al., 2008).

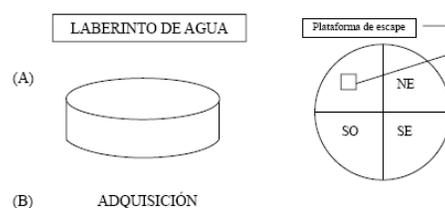
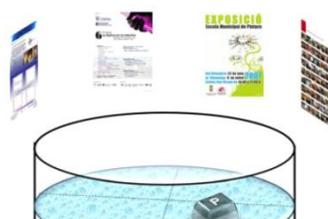




Figura 10. Laberinto acuático de Morris (LAM). Arriba un dibujo que muestra los elementos del LAM: nivel de agua, los cuadrantes, la plataforma (P) oculta y las pistas externas visuales (carteles en los puntos cardinales). Abajo una fotografía del laberinto empleado en el laboratorio de Neurobiología Conductual y Cognitiva del INB, la rata que después de un cierto número de ensayos aprende a escapar del agua, subiéndose a la plataforma, además dos pistas visuales (esquema modificado de León-Jacinto, 2008). A la derecha en A, los elementos del LAM; en B, la prueba de adquisición del primer día en donde se marca la trayectoria de la rata que en el último llega casi de inmediato. En C, la prueba de retención en donde se remueve la plataforma y la rata la busca en el cuadrante donde se localizaba la plataforma (modificado de Vicens et al., 2003).

6.6. Pruebas estadísticas

Dependiendo de las mediciones en cada objetivo, como el efecto de la malnutrición sobre los pesos (corporal, hepático y cerebral) o la respuesta del aprendizaje o la memoria, se empleó la prueba estadística del ANOVA de una vía (grupos Con o M) o el ANOVA de medidas repetidas (estado nutricional x triales) respectivamente. Por cada valor de F significativo las pruebas post-hoc de Tukey o Fisher se emplearon para las diferencias entre los grupos y una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. Las gráficas representan el promedio \pm error estándar.

7. RESULTADOS

7.1 Malnutrición en las madres

Porcentaje de los pesos corporales de las madres durante la gestación con el protocolo impuesto de la malnutrición se muestran en la figura 11, comparados con los pesos de

las madres control. Se realizó la prueba estadística t de Student, en la figura 10 Se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y el grupo malnutrido a partir de la tercera semana de gestación.

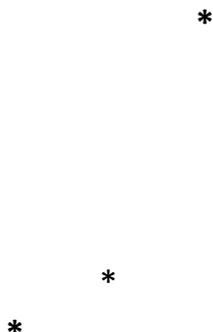


Figura 11. Porcentaje del peso logrado por las hembras primíparas durante la gestación. Grupo control (Con) y grupo malnutrido (M), $n = 35$, $*p < 0.05$.

7.2. Observaciones cualitativas de los neonatos y obtención de la segunda (F2) y tercera (F3) generación filial de ratas malnutridas

En la figura 12, se indican los días del inicio y término de la apertura parpebral en los cuatro grupos. Se encontró un retardo con respecto al grupo control de un día en el inicio de la apertura en el grupo MPre; de 2 días en el grupo MCro y de tres días en el grupo MPos, se realizó un ANOVA ($gl = 156$, $p < 0.0001$). Las hembras malnutridas presentaron también un retraso en la apertura de la cavidad vaginal que se presentó después de los 150 días de edad. Para comprobar su fertilidad, se cruzaron con machos malnutridos de la misma edad, de las 10 ratas que se cruzaron se obtuvieron 9 camadas como F2 y de éstas, después de los 150 días, 8 se cruzaron y se obtuvo la F3 de 5 camadas. Este experimento probó la fertilidad de los animales malnutridos por tres generaciones (no se muestran datos).

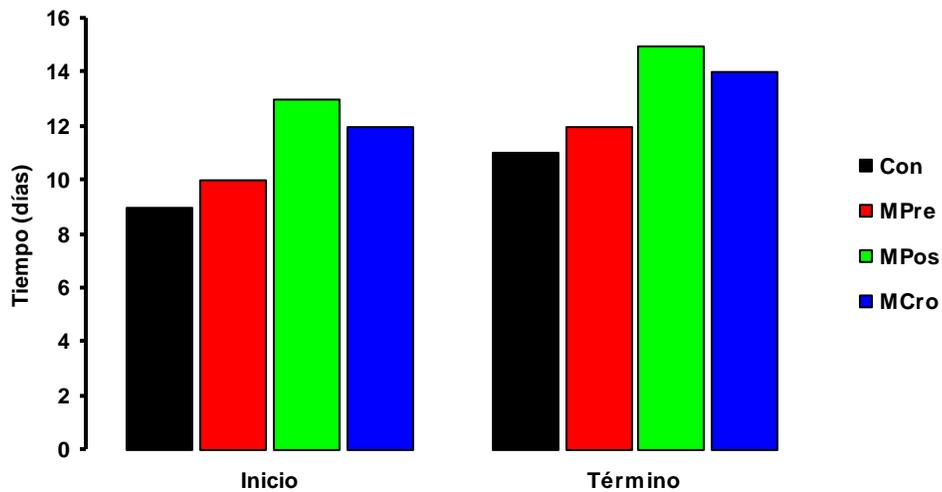


Figura 12. Apertura palpebral en los tres modelos de malnutrición. Se presentó un retraso significativo ($p < 0.0001$) entre los grupos MPre, MPos y MCro con respecto al grupo control (Con), $n=40$.

7.3. Resultados cuantitativos del peso corporal al momento del nacimiento

La Figura 13 muestra las medias y los errores estándar de los dos grupos control y malnutrido al momento del nacimiento (P0), se realizó una t de Student para muestras independientes, la reducción significativa ($t= 14.213$, $P < 0.0001$) entre los grupos (Con) y los malnutridos (M) fue del 30.24%.

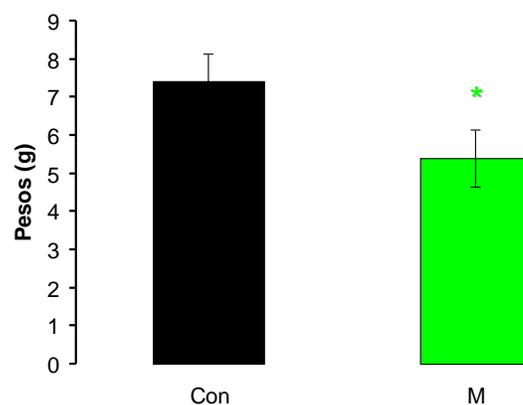


Figura 13. Las medias y errores estándar de los pesos de las crías de ratas malnutridas (con dieta del 6% de caseína). Nótese la reducción en el peso, estadísticamente significativa ($*p < 0.0001$) del peso al nacer en comparación con los recién nacidos de ratas control (Con) nutridas con una dieta normal del 25% de caseína. $n=40$

7.3.1. Pesos cerebral y hepático al momento del nacimiento (P0)

La Figura 14A muestra los grupos control y malnutrido al momento del nacimiento (P0). Se realizó una t para muestras independientes del peso cerebral con una reducción significativa del 18.22% ($p < 0.001$). En la grafica 13B, los grupos control y malnutrido al momento del nacimiento (P0), del peso hepático con una reducción significativa del 40.80%. ($p < 0.001$).

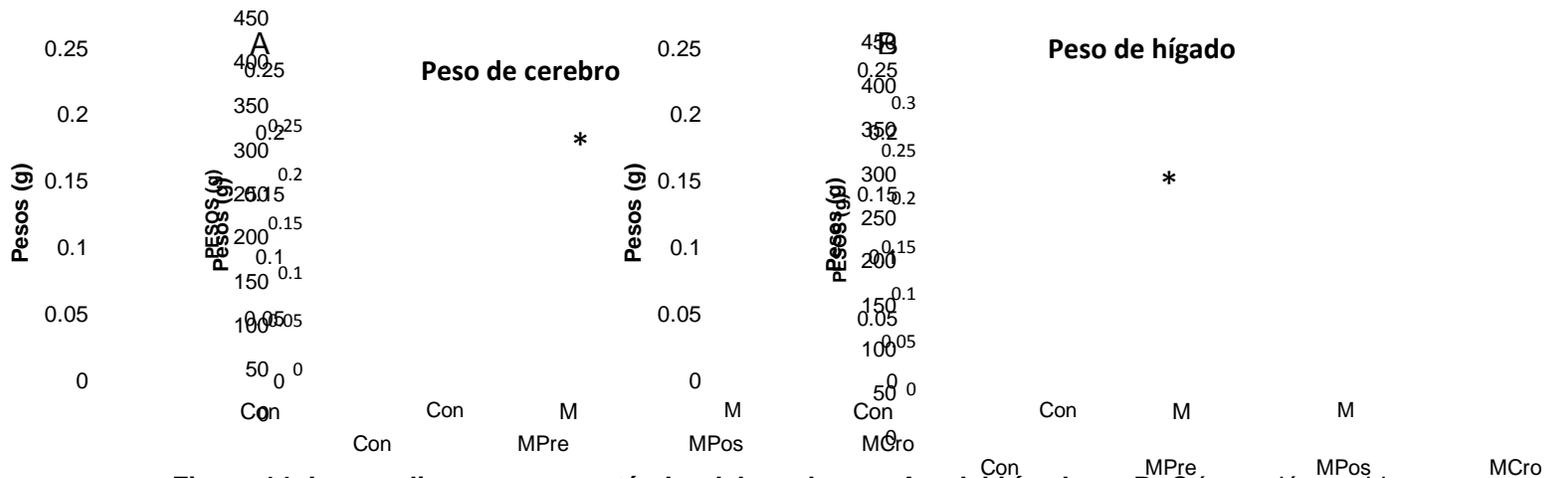


Figura 14. Las medias y errores estándar del cerebro en A y del hígado en B. Crías recién nacidas control (Con) y malnutridas (M). Nótese la disminución significativa (*) en los grupos M, tanto en cerebro como en hígado, n=50.

7.3.2. Índices de los pesos cerebral y hepático con relación al peso corporal (P0)

En la figura 15A se muestran los promedios del índice del peso cerebral entre los grupos control y malnutrido al momento del nacimiento (P0), en donde se nota un aumento significativo del 18.91% ($p < 0.0001$), entre los dos grupos. En la grafica 14B, se muestra los promedios del índice del peso hepático en donde se nota una disminución significativa del 15.55% ($p < 0.0001$) entre los grupos control y malnutrido al momento del nacimiento (P0). Se realizó una prueba t para muestras independientes, n=50.

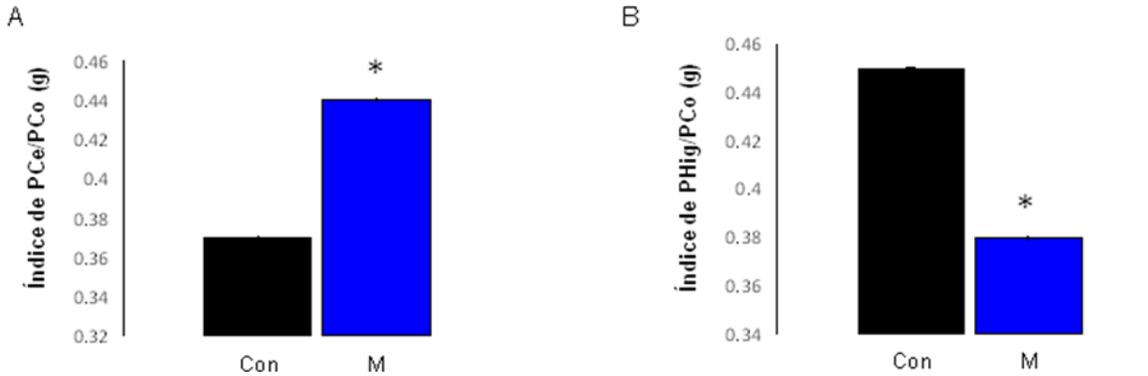


Figura 15. Las medias y errores estándar de los índices cerebral (A) y hepático (B). El índice = peso del cerebro o del hígado entre el peso corporal en gramos de las crías recién nacidas control (Con) y malnutridas (M). Nótese el incremento significativo del índice del peso cerebral en los grupos M, en contraposición con la disminución significativa (*) del índice del hígado, n=50.

7.3.3. Pesos corporales al momento del destete (P23)

La figura 16 muestra las medias y los errores estándar del peso corporal al momento del destete, el análisis estadístico (ANOVA) entre los cuatro grupos mostró diferencias significativas $F_{3,116} = 363.144$ $P < 0.0001$ entre los grupos (Con) y los malnutridos. La prueba *post hoc* de Fisher encontró disminuciones significativas entre los grupos Con vs MCro del 56% ($P < 0.001$) y con el MPos del 9% ($P < 0.001$) y aumento significativo del 8% con el grupo MPre. Los resultados estadísticos de los grupos malnutridos MPre y MPos en comparación con MCro fueron significativas con $p < 0.001$.

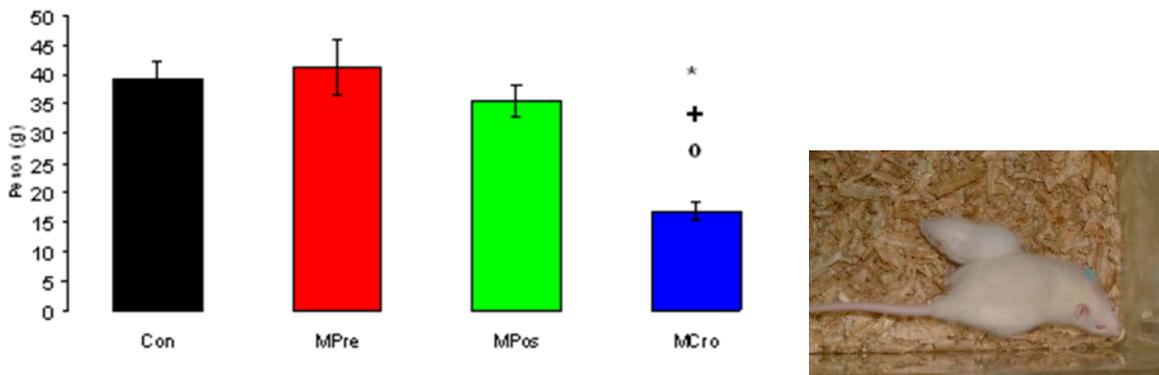


Figura 16. Las medias y errores estándar de los pesos corporales de los 4 grupos experimentales a los 23 días posnatales: control (Con), malnutrido (M); prenatal (MPre), postnatal (MPos) y crónico

(MCro). El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, la cruz (+) con respecto a MPre, y el círculo (o), con respecto a MPos, $n=13$. La fotografía muestra la diferencia de talla entre el animal Con y el MPre.

7.3.4. Pesos corporales después de las pruebas conductuales, 110 días posnatales (P110).

La figura 17 muestra las medias y los errores estándar del peso corporal después de las pruebas conductuales (P110); el análisis estadístico (ANOVA) entre los cuatro grupos mostró diferencias significativas $F_{3,56} = 1004.096$, $P < 0.001$. La prueba *post hoc* de Fisher indicó disminuciones significativas entre el grupo Con y el MCro del 87.4% ($P < 0.001$), así como con el MPos del 79.88% ($P < 0.001$).

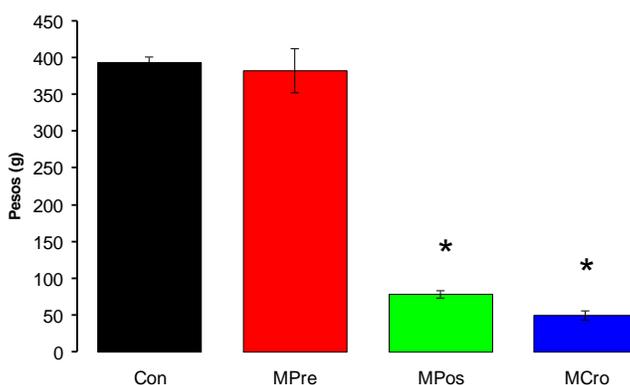
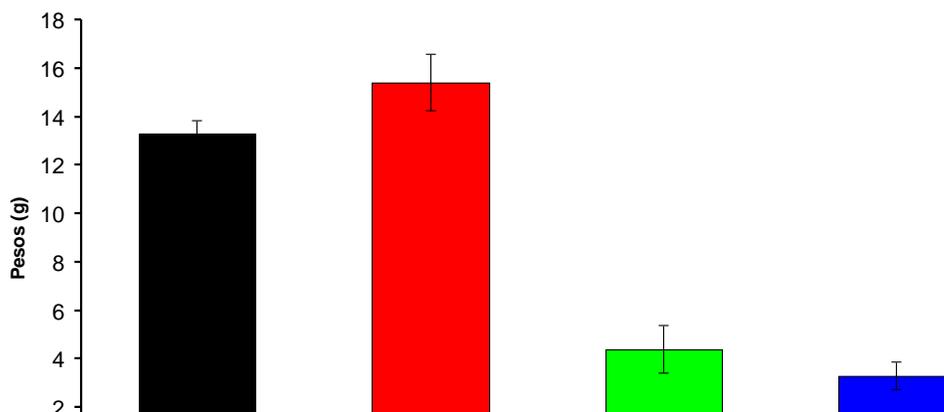


Figura 17. Las medias y errores estándar del peso corporal. Animales machos de 110 días posnatales en los tres grupos de malnutrición, comparados con el grupo Con. Los grupos MPos y MCro mostraron reducciones estadísticamente significativas ($p < 0.001$), con respecto al Con.

La figura 18 muestra las medias y los errores estándar del peso hepático después de las pruebas conductuales y el análisis estadístico (ANOVA) entre los cuatro grupos indicó diferencias significativas $F_{3,56} = 31.029$, $P < 0.0001$. La prueba *post hoc* de Fisher encontró disminuciones significativas con respecto al Con del grupo MCro del 23.17% ($P < 0.001$) y con el MPos del 18.67% ($P < 0.001$). Además las comparaciones entre el grupo MPre con los grupos MPos y MCro fueron significativas con $p < 0.001$.



*

*

Figura 18. Las medias y errores estándar del peso hepático. Animales machos de 110 días posnatales en los tres grupos de malnutrición (MPre, MPos y MCro), comparados con el grupo control (Con). Los grupos MPos y MCro mostraron reducciones estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) con respecto al grupo Con.

La figura 19 muestra las medias y los errores estándar del peso cerebral después de las pruebas conductuales y el análisis estadístico (ANOVA) entre los cuatro grupos indicó diferencias significativas $F_{3,56} = 31.029$ $P < 0.001$. La prueba *post hoc* de Fisher encontró disminuciones significativas con respecto al grupo Con con el grupo MCro del 23.17% ($P < 0.001$) y con el MPos del 18.67% ($P < 0.001$). Además las comparaciones entre el grupo MPre y MPos con el grupo MCro fueron significativas con $p < 0.001$.

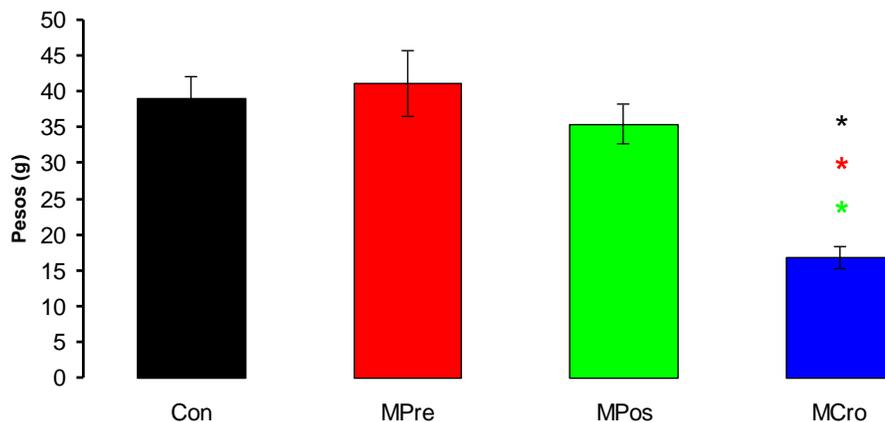


Figura 19. Las medias y errores estándar del peso cerebral. Animales machos de 110 días posnatales en los tres grupos de malnutrición, comparados con el grupo Con. El grupo MCro mostró reducciones estadísticamente significativas ($p < 0.001$), con respecto al Con.

7.3.5. Índices de los pesos del hígado y del cerebro entre el peso corporal, después de las pruebas conductuales (P110)

La figura 20 muestra las medias y los errores estándar del índice del peso hepático (PHig) entre el peso corporal (PHig/PCo) después de las pruebas conductuales y el análisis estadístico (ANOVA) entre los cuatro grupos mostró diferencias significativas $F_{3,56} = 15.745$, $P < 0.0001$. La prueba *post hoc* de Fisher encontró aumentos significativos con respecto al Con con el MCro del 97.06% ($P < 0.001$), y con el MPos del 79.41% ($P < 0.007$) y aumento significativo del 20.59% con respecto al Con con el MPre. Además las comparaciones entre los grupos malnutridos fueron significativas con $p < 0.001$, con respecto al MPre con el MCro y con con el MPos, con respecto al MCro con el MPos la diferencia fue $P < 0.05$.

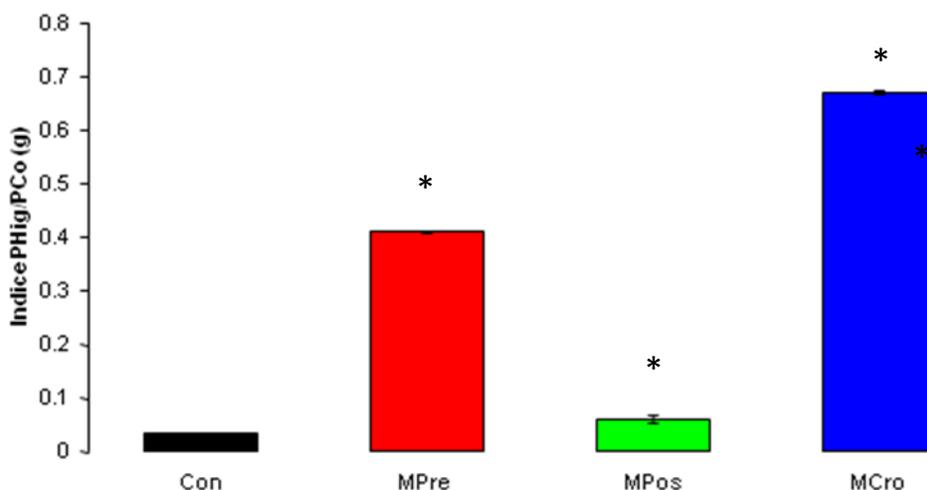


Figura 20. Las medias y errores estándar del índice del peso del hígado. El índice =PHig/PCo en gramos (g) de animales machos de 110 días posnatales en los tres grupos malnutridos prenatal (MPre), posnatal (MPos) y crónico (MCro), comparados con el grupo Con. Los grupos MPre y MCro mostraron aumentos estadísticamente significativos ($p < 0.0001$), con respecto al Con, y entre el MPre con respecto al MPos y MCro.

La figura 21 muestra las medias y los errores estándar del índice entre el peso cerebral (PCe) y el corporal PCo (PCe/PCo), después de las pruebas conductuales y el análisis estadístico (ANOVA) entre los cuatro grupos mostró diferencias significativas $F_{3,56} = 97.778$ $P < 0.0001$. La prueba *post hoc* de Fisher indicó aumentos significativos entre los grupos Con vs MCro del 480% ($P < 0.001$) y con el MPos del 300% ($P < 0.001$), y disminución significativa en los grupos MPre y MPos con respecto a grupo MCro de $P < 0.001$.

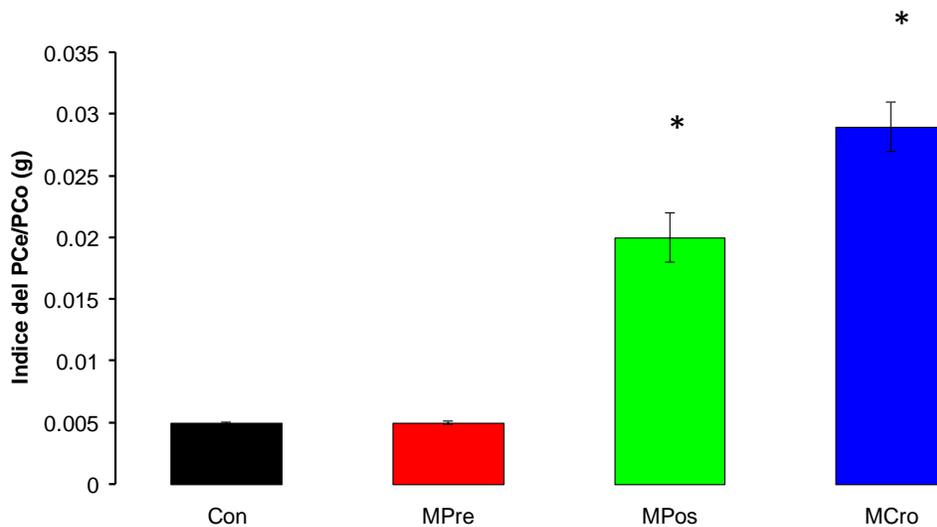


Figura 21. Las medias y \pm errores estándar del índice del peso cerebral. El índice = al peso cerebral (Ce) sobre el corporal (PCe/PCo) en gramos (g) de animales machos de 110 días posnatales en los tres grupos malnutridos prenatal (MPre), posnatal (MPos) y crónico (MCro), comparados con el grupo Con. Los grupos MPos y MCro mostraron aumentos estadísticamente significativos ($p < 0.001$), con respecto al Con y entre el MPre con respecto al MPos y MCro de $P < 0.001$.

7.4. Resultados de la prueba conductual LAM

Los resultados de la ejecución en el LAM se presentan como el promedio de pares de ensayos de cada día en los cuatro grupos: Con, MPre, MPos y MCro cada uno con 10 animales, figura 21. El ANOVA de medidas repetidas mostró diferencias significativas entre los grupos y entre los ensayos por cada día: Día 1, $F_{3,36} = 7.38$ $P < 0.006$; y la *post hoc* de Tuckey indicó que las diferencias significativas ($P < 0.05$) fueron entre el Con Vs el MCro, entre este y el MPre y entre los malnutridos Pre y Pos. En el día 2, los valores

de la $F_{3,36} = 5.192$ $P < 0.004$, la *post hoc* indicó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos Con vs MCro y MCro vs MPre. En el día 3, el valor de la $F_{3,36} = 6.178$ $P < 0.0001$ y la *post hoc* mostró diferencias entre los mismos grupos. En los días 4, 5 y 6 los valores fueron $F_{3,36} = 10.34$ $P < 0.001$; $F_{3,36} = 6.972$ $P < 0.008$ y $F_{3,36} = 6.778$ $P < 0.001$, respectivamente y la *post hoc* de Tukey indicó diferencias significativas entre los grupos Con vs MCro, vs MPos y entre los grupos MPre vs MCro y MPre en los tres días.

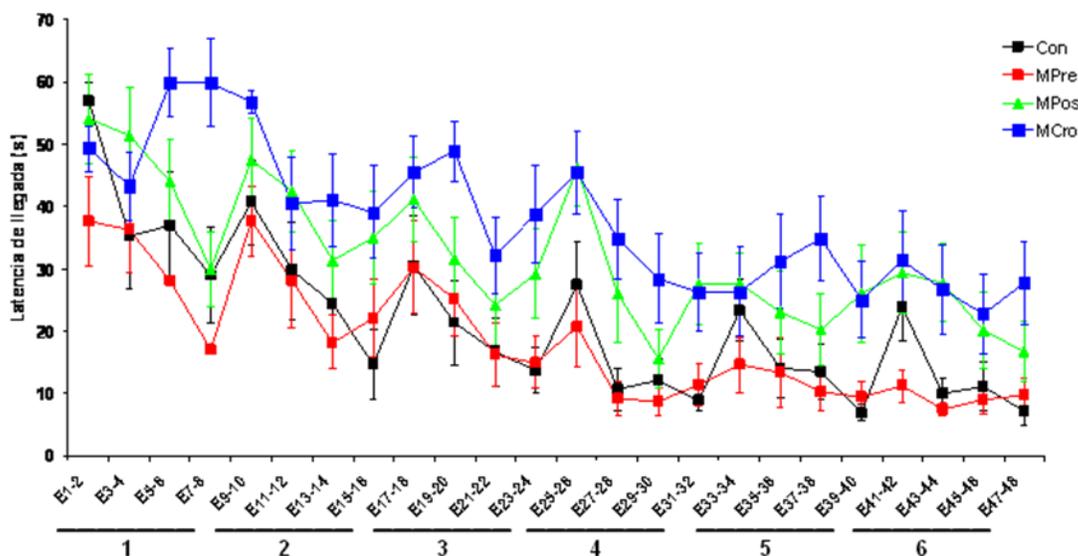


Figura 22. Las medias y errores estándar de los ensayos en cada día (1-6). En los grupos malnutridos: prenatal (MPre), posnatal (Pos) y crónico (MCro) con respecto al grupo control (Con). Nótese que al inicio de la prueba el grupo MCro, tuvo la mayor latencia de llegada a la plataforma. Conforme se someten a los siguientes ensayos todos los grupos van reduciendo el tiempo de llegada, sin embargo los grupos MCro y MPos no extinguen el tiempo de llegada como lo hacen los grupos MPre y el Con. Encontrándose las diferencias significativas entre el grupo MCro con respecto a los demás grupos en los pares de ensayos (E) 5-6; 7-8 (1); 19-20 (3); 25-26 (4); 37-38, 39-40 (5) y 43-44 (6). El grupo MPos mostró diferencias en el par de ensayos 23-24, 25-26 y 27-28 (4); 33-34 y 35-36 (5) y 43-44 (6). No habiendo diferencias entre los grupos Con y MPos.

En la figura 23, se separaron los grupos con la finalidad de mostrar con mayor claridad las diferencias entre los grupos malnutridos con referencia al grupo control, se graficaron las medias y los errores estándar por pares de ensayos por día en los cuatro grupos. Cada figura muestra el efecto del entrenamiento que de manera progresiva va

disminuyendo el tiempo de la llegada a la plataforma. Sin embargo, los grupos M tanto Pos como Cro, tuvieron mayor latencia de llegada a la plataforma, en todos los días de la prueba, siendo el MCro el de mayor latencia en todos los días de la prueba.

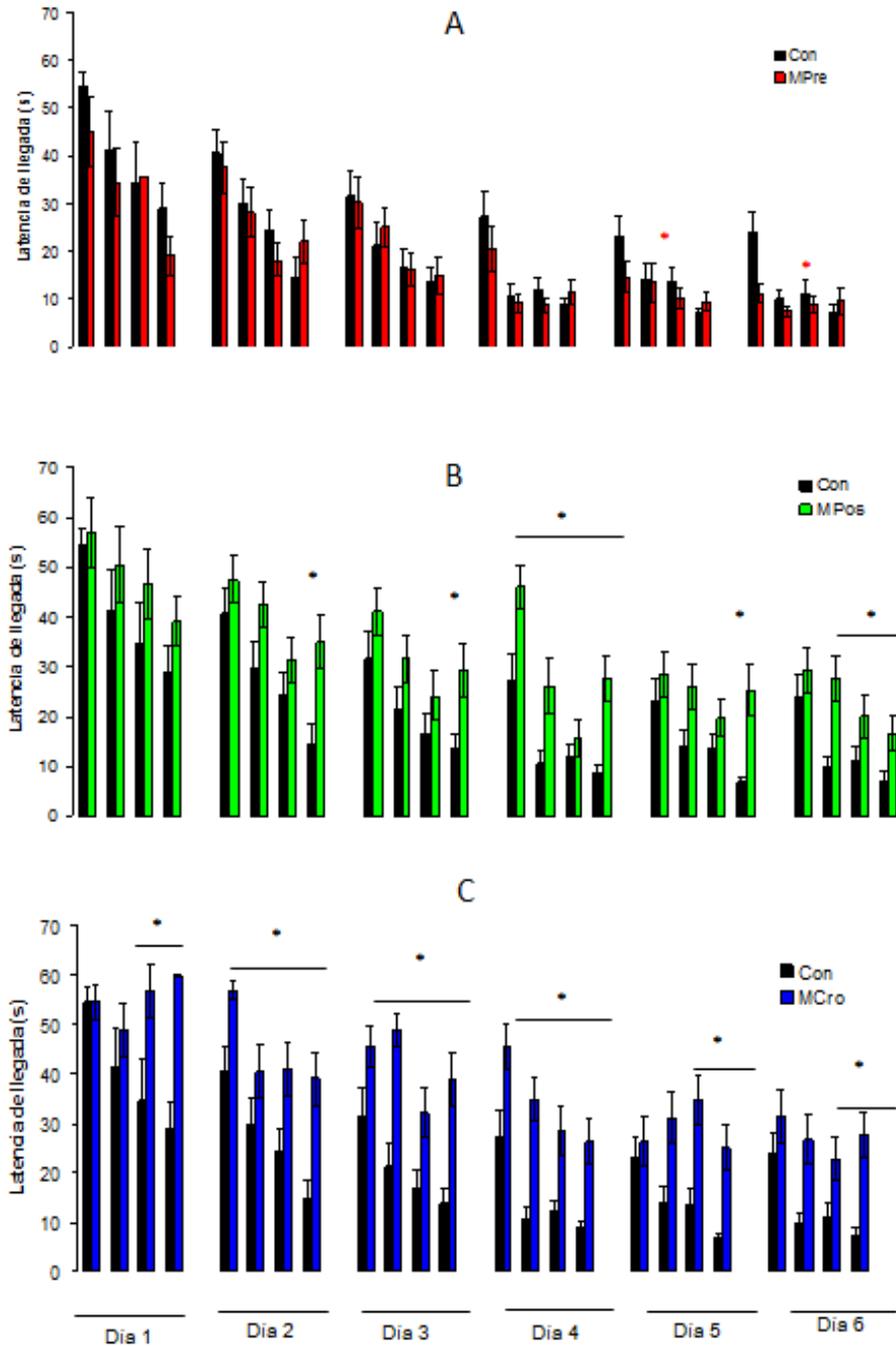


Figura 23. Las medias y errores estándar de pares de ensayos en cada día (1-6). En A, los grupos control (Con) y malnutridos prenatal (MPre); en B, el grupo Con y el malnutrido posnatal (MPos) y en C, el control y el manutrido crónico (MCro). Nótese que el grupo MPre es similar al Con y que los grupos MPos y MCro mostraron mas latencia en todos los días de la prueba, comparados con el grupo Con.

7.4.1. Promedios del tiempo en segundos para adquirir el aprendizaje de los grupos MPre, MPos y MCro comparados con el grupo Con por cada día

En la figura 24, se muestran la media y los errores estándar por pares de ensayos de los cuatro grupos (n=40); control (Con) y malnutridos (M) prenatal (MPre); posnatal (MPos) y crónico (MCro) y por cada día. El ANOVA factorial, mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los grupos en el primer día de $F_{3,316} = 17.136$; en el segundo $F_{3,316} = 12.589$; en el tercero de $F_{3,316} = 16.958$; en el cuarto día $F_{3,36} = 24.382$, en el quinto $F_{3,36} = 17.619$ y en el sexto de $F_{3,316} = 20.109$. La prueba *post hoc* de Tuckey, indicó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos: Con vs los grupos MPre y MCro en el día uno y entre MPos y MCro en día dos. En los días 3 y 4, las diferencias significativas entre los grupos fueron Con vs los grupos MPos y MCro y entre los grupos MPre y MCro en ambos días. En el día 5 las diferencias fueron entre los grupos Con vs los grupos MPos y MCro y entre los grupos MPre y MCro. En el día 6 las diferencias fueron de entre el grupo Con vs los grupos MPos y MCro.

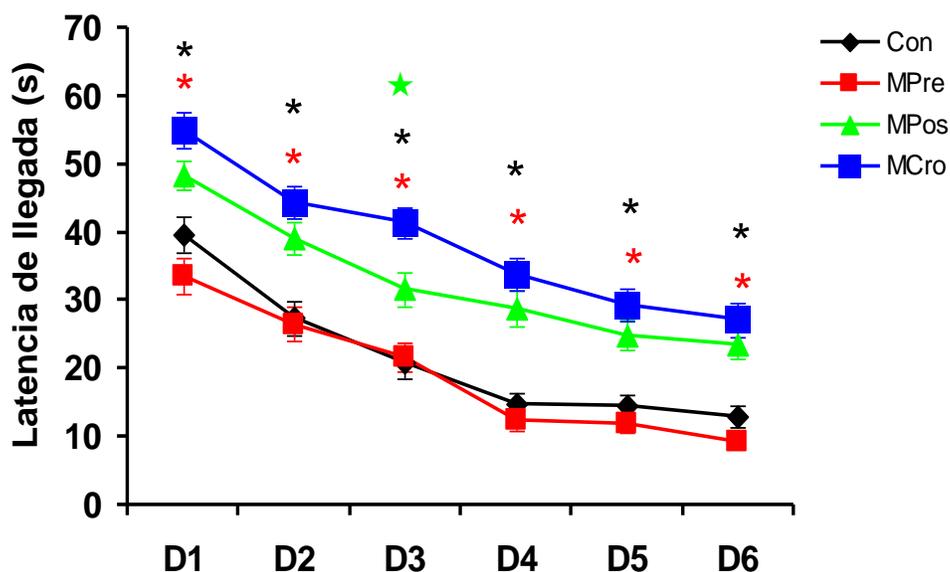


Figura 24. Adquisición de la tarea. El eje de las ordenadas representa el promedio de la latencia para encontrar la plataforma oculta (máximo 60 segundos). El eje de las abscisas refiere los 6 días (D) con el promedio de los 8 ensayos por sesión de entrenamiento. Se muestra la barra del error estándar para el promedio de cada grupo por día. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) en entre los grupos control (Con) y malnutrido posnatal (MPos) con los grupos malnutrido crónico (MCro) y malnutrido posnatal (MPos), en cada día se indican con un asterisco negro y rojo, respectivamente. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los grupos MCro y el MPos, se indican con una estrella verde. Se puede apreciar el comportamiento claro de dos poblaciones las de los Con similar al grupo rehabilitado al nacimiento (MPre) y el de los otros grupos malnutridos (MPos y MCro) que no aprendieron con la misma latencia.

8. DISCUSIÓN

El estudio de la malnutrición en diferentes periodos del desarrollo fue importante porque su efecto sobre el SNC en general y en el hipocampo en particular, depende del periodo en el que es instalada. Se sabe que es un factor importante puesto que se manifiestan sus efectos desde la reducción de la talla, y en los pesos corporal y cerebral hasta en la estructura anatómica y funcional del SNC (García-Ruiz et al., 1993; Morgane et al., 1993; Granados-Rojas et al., 2002; Martínez et al., 2009; Díaz-Cintra et al., 2007).

Así, en este estudio, se determinó el peso de las hembras que han sido malnutridas durante su etapa de gestación en donde se les malnutrió desde 4 semanas antes del apareamiento con una dieta isocalórica e hipoproteínica con tan solo 6% de caseína, comparadas con aquellas que fueron bien nutridas con la dieta estandar para roedor. Los resultados obtenidos de los pesos corporales de todas madres, indicaron que al final de la gestación, los controles aumentaron en un 60% del peso en tanto que las madres gestantes malnutridas, presentaron solo un 10% de aumento en el peso corporal. Se observó además que durante la 1ª primera semana de malnutrición, en tanto los controles aumentaban su tasa de crecimiento, las ratas malnutridas se mantuvieron en el peso y luego bajaron en la 3ª semana y aumentaron en la 4ª y 5ª semanas (Figura 21). El periodo de apareamiento se llevó a cabo en la 4ª semana y posterior a ésta, el incremento de peso durante la gestación fue significativo.

La dieta empleada, ha sido probada por mucho tiempo en los diversos estudios experimentales principalmente durante el periodo prenatal (Morgane et al., 1993; Díaz-Cintra et al, 1997a,b; 2007). Los estudios se han basado en los efectos anatómicos, neuroquímicos y conductuales que presentan estos animales malnutridos en diferentes edades posnatales. Hasta el presente no se ha reportado, en las crías, el efecto de la malnutrición (M) en cada periodo del desarrollo (prenatal Pre; posnatal Pos; o en ambos Cro), por lo que se diseñó el estudio en estos tres modelos, para describir en las crías de un modo cualitativo algunos aspectos somatotópicos como lo fue el tiempo de la apertura palpebral (párpados). Así se observó un retraso importante de un día en el modelo de MPre, de dos días en el MCro y de 3 días en el modelo de MPos, como se indica en la Tabla 1. Esta observación pone de manifiesto el retardo en los sistemas

sensoriales producto del bajo peso al nacimiento: en las hembras, además se encontró también un retardo en la apertura vaginal, lo que llevó hacer un seguimiento del tiempo en el que éstas pudieran ser fértiles, así se encontró que hasta después del día P150, éstas mantuvieron su capacidad reproductiva. Se comprobó esta fertilidad hasta la tercera generación (F3). En estudios efectuados por el grupo del Dr. Salas, han reportado retrasos en las aperturas palpebral y óptica pero en animales que han sido desnutridos en la etapa posnatal, en otro estudio en donde investigaron la interacción de la madre con las crías desnutridas, sobre la respuesta urogenital en el recién nacido, sugieren que la desnutrición neonatal puede desempeñar un papel en interacción madre-hijo, interfiriendo con estas respuestas del lamino urogenital de la madre a las crías (Salas et al., 1998).

Con referencia al retardo en la maduración sensorial ocurrida por la desnutrición, en el sistema auditivo, se ha reportado una reducción de la percepción de señales auditivas y esto afecta de manera indirecta el mantenimiento del árbol dendrítico, durante el desarrollo y, posiblemente, la convergencia de la experiencia auditiva a las neuronas piramidales y esto puede interferir con la modulación neocortical postural y de los movimientos (Torrero et al., 2004).

En el laboratorio, se ha producido la malnutrición además, en los periodos posnatal y de manera crónica hasta edades adultas madura y senil (Martínez, et al., 2009). Así se ha reportado que esta dieta instalada en distintos periodos del desarrollo provoca disminuciones importantes en el peso corporal y cerebral, siendo significativas en el peso corporal cuando los animales han sido malnutridos durante los periodos posnatal y desde la concepción hasta la vida adulta, como lo muestran las figuras de pesos, en particular en las edades adultas. Estas deficiencias en ocasiones son de hasta más del 60%, en este estudio se puede apreciar que en tanto el grupo con rehabilitación nutricional (MPre) no presentó diferencias significativas con el grupo control, si ocurrió con los grupos MPos y MCro. Esta reducción se manifiesta también en los órganos internos como el hígado, páncreas, suprarrenales y testículos, en este estudio solo se reportan los pesos de los hígados en todos los modelos empleados. Al momento del nacimiento, la reducción en el peso del hígado es del 40% en relación del 18% del peso cerebral, sin embargo cuando se obtuvo el índice, PCe/PCo, entonces

los animales malnutridos presentaron un aumento del 18.9% y del índice del hígado del 15%. Esto hace pensar por una parte, que el cerebro se encuentra mas protegido por este efecto de la malnutrición y por otra que se conserva una relación con el peso del hígado (15%) que se reduce en proporción. Con relación a las alteraciones posibles hepáticas y el estrés oxidativo que la malnutrición pudiera producir en términos de esteatosis el trabajo de Grattagliano et al., 2008, mostró que la transformación de los adipositos y hepatocitos es acompañada por los principales modificaciones relacionadas entre sí con los parámetros del estrés oxidativo especialmente a nivel mitocondrial, sugiriendo una pronta respuesta adaptativa de protección sino también una mayor predisposición a los insultos pro-oxidantes.

Cuando se obtuvieron las mediciones de los pesos corporales al destete (otro periodo crítico), se encontró que el grupo MCro, presentó el menor peso (56%) y el MPos se redujo solo en un 9%, aunque el crecimiento se detuvo o fue muy lento, esto se afirma cuando se calculan los gramos ganados por día. Así, al destete, los animales Con y MPre tuvieron una ganancia de 1.74 g y de 1.85 g por día, respectivamente en tanto el grupo MCro lo tuvo de 0.52 y el MPos de solo 0.65 g. Esta relación en la tasa de crecimiento en el adulto, es muy alta para los grupos Con de 3.64 g y de 3.55 g para el MPre, en tanto los grupos MCro y del MPos fue solo de 0.72 g, reflejada en la disminución del peso corporal de más del 87% en el MCro y del 79% en el MPos. Adicional a estas observaciones, el registro de los pesos del hígado y del cerebro se redujeron en 75% y 67%, respectivamente. Pero cuando se hicieron las relaciones entre los pesos corporales, los grupos MCro y MPos mostraron los mayores índices (ver figuras 20 y 21).

Estos resultados ponen de manifiesto la protección que desarrolla el cerebro en periodos críticos de malnutrición, al menos en términos de peso y de quizás una hiperplasia en el hígado ya que por observaciones histológicas, se ha detectado un importante grado de esteatosis y de fibrosis, asociadas quizás a un estrés oxidativo, investigación en curso en los tres modelos de malnutrición.

Adicionalmente, existen estudios del impacto de la malnutrición sobre el estrés oxidativo cerebral que puede producir alteraciones en estructuras que regulan funciones como la memoria y aprendizaje de tipo espacial. De hecho, esta fórmula (ver

Tabla I) es isocalórica e hipoproteínica en donde el contenido de la L-metionina y de la caseína fueron los mínimos necesarios para garantizar la síntesis de otras proteínas (epinefrina y creatinina), así como nucleótidos metilados y la glutatión implicada en la función antioxidante (Griffith, 1999; Li et al., 2002). Así las madres gestantes empleadas en el estudio se sometieron a esta dieta desde cuatro semanas previas al apareamiento para provocar una adaptación a este régimen nutrimental, se formaron dos grupos de madres malnutridas, cada uno de 35 animales y se reportó la ganancia del peso durante la gestación como se indica en la Figura 12 (los datos se expresan con un índice; peso inicial/peso final). Así como el peso de sus crías al nacer que fueron las de menor peso tanto corporal como cerebral (Figuras 13 y 14), porque se formaron en úteros de madres con una adaptación a la malnutrición previa a la gestación.

La malnutrición proteínica causa efectos deletéreos en el desarrollo de programas que controlan la sinaptogénesis y/o la consolidación sináptica (Granados Rojas 2002). Estos efectos llegan a alterar la estructura y funcionamiento del hipocampo, que es una de las principales estructuras que se relacionan con el aprendizaje de tipo espacial (O'Keefe, 1990, D'Hooge & De Deyan, 2001). Los circuitos del hipocampo son marcadamente plásticos, y esta capacidad está mediada en gran parte por procesos de potenciación y depresión a largo plazo. Los mecanismos de plasticidad sináptica en el hipocampo son solo un paso hacia la formación de la memoria a largo plazo y su alteración podría subyacer a las deficiencias de memoria observadas en animales malnutridos y desnutridos. Este aspecto para relacionar los cambios conductuales a los anatómicos del hipocampo, se encuentra también en evaluación, aunque es importante aclarar que es una sola de las estructuras cerebrales involucradas en esta importante función cognitiva.

Con referencia a la prueba conductual a la que fueron sometidos los cuatro grupos experimentales, y como ya se mencionó, permite de un modo adecuado valorar la adquisición del aprendizaje aumentando el número de ensayos y de días. En el diseño se valoraron hasta 6 días cada uno con 8 ensayos, pudiéndose encontrar dos grupos de individuos; aquellos que consumieron menor tiempo para escapar del agua,

(Con y MPos), y aquellos que lograron adquirir el aprendizaje, después de varios ensayos y éstos fueron los grupos MPos y MCro, que requirieron el doble de tiempo, como se indica en la figura 23. Faltaría saber la capacidad de retención y de memoria en los 3 grupos, como se puede apreciar en la figura 22, el promedio del primer y segundo ensayos de cada día, en todos los grupos se inicia alrededor de los 40 segundos, es decir consumen mas tiempo para re-ubicarse de nuevo en la prueba, sin embargo al final del 7-8º ensayos los grupos Con y MPre consumen el menor tiempo (12s), no así los MPos y MCro que se meantienen arriba de los 35 segundos (ver graficas 22 y 23). Aunque llama la atención el hecho que el grupo MPre no mostró el incremento al inicio de cada par de ensayos en cada día, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo.

Por otra parte, si se considera el tiempo de 15 segundos como el de la adquisición del entrenamiento alcanzado por el grupo Con en el día 3; entonces solo el grupo MPre lo logró pero en el día 4, ambos grupos Con y MPre, lo mantuvieron en los subsecuentes días 5 y 6. Por el contrario los animales MPre y MCro, tuvieron el doble del tiempo (30 segundos), ver Figuras 22 y 23. Estas observaciones ponen de manifiesto por una parte de que el sobre entrenamiento permite adquirir el aprendizaje de escapar a la plataforma no importando la restricción nutrimental e incluso el tamaño y peso corporal, pero por otra que quizás se requiere de mayor numero de ensayos para que estos animales malnutidos (MPos y MCro) pudieran lograrlo. Sin embargo, en la figura 24, se indica que estos grupos, tuvieron el mayor tiempo sostenido en los últimos 3 días de la prueba y que las diferencias de cada par de ensayos fueron significativamente mayores sobre todo en el grupo MCro.

Estas observaciones ponen de manifiesto que la malnutrición produce efectos diferentes según el tiempo en el que se instale durante el desarrollo y los periodos críticos posnatales. Aunque las pruebas de este tipo, por sobre entrenamiento aparentemente logren compensar estos efectos negativos de la malnutrición faltaría saber si son capaces de recordar la tarea. En este aspecto, en nuestro laboratorio, se han realizado pruebas de condicionamiento operante como la evitación inhibitoria, donde ratas jóvenes y seniles malnutridas en el periodo posnatal (MPos) no recuerdan

la tarea a largo plazo, debido a las alteraciones funcionales del hipocampo (Martínez et al., 2009).

Con relación a las alteraciones viscerales y la capacidad adaptativa de los organismos malnutridos para adquirir el aprendizaje de tipo espacial, no hay en la literatura un estudio de esta relación. Lo que se ha relacionado es que la malnutrición perinatal puede ser un agente prooxidante que incrementa la deficiencia en la actividad física en la vida adulta alterando el metabolismo glucídico y lipídico que conducen a un fenotipo de deficiencia de energía que pudiera repercutir en la calidad de respuesta a las pruebas conductuales. Pero es evidente, que un estudio de esta naturaleza, en donde se someten a los animales malnutridos a un nivel de demanda fisiológica habría que considerar al menos la respuesta de las enzimas asociadas al metabolismo energético glucococinasa y la fosfructoquinasa (enzimas claves de glucólisis), la acetil-CoA carboxilasa (enzimas claves de lipogénesis) y los niveles de glicemia, tolerancia a la glucosa hepática, etc. Así mismo la relación con el peso de otros órganos igualmente importantes como las suprarrenales y el páncreas que también se alteran o bien se adaptan a este tipo de malnutrición. Por lo tanto, se requería de mayores datos sobre todo en los órganos mencionados además de establecer los niveles séricos por ejemplo de corticosteroides asociados al buen funcionamiento y adaptación del organismo completo para poder responder a una prueba de este tipo.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo, revelan alteraciones desde el peso corporal, hepático y cerebral en diferentes periodos críticos del desarrollo, hasta severas dificultades para la adquisición de la tarea de tipo espacial en especial de los grupos MPos y MCro. Sin embargo, al incrementarse el número de ensayos, estos sujetos logran aprender aunque requirieron del doble del tiempo.

9. CONCLUSIONES

Al momento del nacimiento, hay una reducción en el peso corporal, del hígado y del cerebro. Sin embargo cuando se hace la comparación con el peso corporal, entonces los animales malnutridos presentan aumentos en el hígado y en el cerebro.

Durante el destete, los animales MPos y MCro presentan un bajo peso y su tasa de crecimiento se mantiene reducida hasta la edad adulta en donde la tasa de crecimiento se reduce más del 20%.

Los resultados de la prueba conductual, sugieren que el sobre entrenamiento ayuda a compensar los efectos causados por la malnutrición instalada en diferentes tiempos del desarrollo.

Los animales MPos y MCro requirieron de mayor número de ensayos para adquirir la tarea. El grupo MPre se comportó de manera semejante al control.

Finalmente, el estudio pone de manifiesto que los animales malnutridos, logran conservar la plasticidad funcional cerebral que les permite adaptarse a la demanda medioambiental, y esta respuesta dependerá del grado de malnutrición al que son sometidos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Aguilar, L. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología*, 32(4), 373-381.
- Ahmed, M. G., Bedi, K. S., Warren, M. A., & Kamel, M. M. (1987). Effects of a lengthy period of undernutrition from birth and subsequent nutritional rehabilitation on the synapse: granule cell neuron ratio in the rat dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, 263(1), 146-158.
- Almaguer-Melián, W., & Bergado-Rosado, J. A. (2002). Interacciones entre el hipocampo y la amígdala en proceso de plasticidad sináptica. Una clave para entender las relaciones entre motivación y memoria. *Revista de Neurología*, 35(6), 586-593.
- Andrade, J. P., Cadete-Leite, A., Madeira, M. D., & Paula-Barbosa, M. M. (1991). Long-term low-protein diet reduces the number of hippocampal mossy fiber synapses. *Experimental Neurology*, 112(1), 119-124.
- Andrade, J. P., Castanheira-Vale, A. J., Paz-Dias, P. G., Madeira, M. D., & Paula-Barbosa, M. M. (1996). The dendritic trees of neurons from the hippocampal formation of protein-deprived adult rats. A quantitative Golgi study. *Experimental Brain Research*, 109(3), 419-433.
- Andrade, J. P., & Paula-Barbosa, M. M. (1996). Protein malnutrition alters the cholinergic and GABAergic systems of the hippocampal formation of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neuroscience letters*, 211(3), 211-215.
- Bailey, C. H., Giustetto, M., Huang, Y. Y., Hawkins, R. D., & Kandel, E. R. (2000). Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 1(1), 11-20.
- Balderas, I., Ramírez-Amaya, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Cambios morfológicos asociados a la memoria. *Revista de Neurología*, 38(10), 944-948.
- Bedi, K. S. (1992). Spatial learning ability of rats undernourished during early postnatal life. *Physiology & Behavior*, 51(5), 1001-1007.
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(6407), 31-39.
- Bonatto, F., Polydoro, M., Andrades, M. E., da Frota Junior, M. L., Dal-Pizzol, F., Rotta, L. N., et al. (2005). Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Research*, 1042(1), 17-22.
- Bourre, J. M. (2004a). Effets des nutriments sur les structures et les fonctions du cerveau: le point sur la diététique du cerveau. *Revue neurologique*, 160(8-9), 767-792.
- Bourre, J. M. (2004b). Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 8(3), 163-174.
- Brandeis, R., Brandys, Y., & Yehuda, S. (1989). The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *The International Journal of Neurosciences*, 48(1-2), 29-69.

- Bronzino, J. D., Blaise, J. H., Mokler, D. J., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (1999). Modulation of paired-pulse responses in the dentate gyrus: effects of prenatal protein malnutrition. *Brain Research*, 849(1-2), 45-57.
- Brown, M. L., & Guthrie, H. A. (1968). Effect of severe undernutrition in early life upon body and organ weights in adult rats. *Growth*, 32(2), 143-151.
- Burke, R. E. (2007). Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain*, 130(Pt 4), 887-894.
- Bush, M., & Leathwood, P. D. (1975). Effect of different regimens of early malnutrition on behavioural development and adult avoidance learning in Swiss white mice. *The British Journal of Nutrition*, 33(3), 373-385.
- Castro, C. A., Tracy, M., & Rudy, J. W. (1989). Early-life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. *Behavioural Brain Research*, 32(3), 255-264.
- Cintra, L., Aguilar, A., Granados, L., Galván, A., Kemper, T., DeBassio, W., et al. (1997a). Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus*, 7(2), 192-203.
- Cintra, L., Granados, L., Aguilar, A., Kemper, T., DeBassio, W., Galler, J., et al. (1997b). Effects of prenatal protein malnutrition on mossy fibers of the hippocampal formation in rats of four age groups. *Hippocampus*, 7(2), 184-191.
- Coupé, B., Grit, I., Darmaun, D., & Parnet, P. (2009). The timing of "catch-up growth" affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 297(3), R813-824.
- Crusio, W. E., & Schwegler, H. (2005). Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. *Behavioral and Brain Functions*, 1, 1-11.
- D'Hooge, R., & de Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews*, 36(1), 60-90.
- De la Mata, C. (2008). Malnutrición, desnutrición y sobrealimentación. *Revista Médica de Rosario*, 74, 17-20.
- Desai, M., Gayle, D., Babu, J., & Ross, M. G. (2005). Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193(3 Pt 2), 1224-1232.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, A., Kemper, T., & Morgane, P. J. (1991). Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *The Journal of Comparative Neurology*, 310(3), 356-364.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O., & Morgane, P. J. (1981). The effects of protein deprivation on the nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Research*, 221(2), 243-255.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Resnick, O., & Morgane, P. J. (1984). The effects of protein deprivation on the nucleus *locus coeruleus*: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Research*, 304(2), 243-253.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Ortega, A., Kemper, T., & Morgane, P. J. (1990). Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups. *The Journal of Comparative Neurology*, 292(1), 117-126.

- Díaz-Cintra, S., Garcia-Ruiz, M., Corkidi, G., & Cintra, L. (1994). Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Research*, 662(1-2), 117-126.
- Díaz-Cintra, S., González-Maciel, A., Morales, M. A., Aguilar, A., Cintra, L., & Prado-Alcalá, R. A. (2007). Protein malnutrition differentially alters the number of glutamic acid decarboxylase-67 interneurons in dentate gyrus and CA1-3 subfields of the dorsal hippocampus. *Experimental Neurology*, 208(1), 47-53.
- Domínguez YL. 2009. La dieta en la enfermedad de Alzheimer, The diet in Alzheimer's disease. *Revista Cubana de Salud Pública*. 35:55-64.
- Farr, S. A., Flood, J. F., & Morley, J. E. (2000). The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic, and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 73(2), 150-167.
- Feoli, A. M., Siqueira, I. R., Almeida, L., Tramontina, A. C., Vanzella, C., Sbaraini, S., et al. (2006). Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition*, 22(2), 160-165.
- Fukuda, M. T., Francolin-Silva, A. L., & Almeida, S. S. (2002). Early postnatal protein malnutrition affects learning and memory in the distal but not in the proximal cue version of the Morris water maze. *Behavioural Brain Research*, 133(2), 271-277.
- Grattagliano, I., Caraceni P., Calamita, G., Ferri, D., Gargano, I., Palasciano, G. & Portincasa, P. (2008). Severe liver steatosis correlates with nitrosative and oxidative stress in rats. *Eur J Clin Invest*. 38:523-30.
- Galindo, L. E., Garín-Aguilar, M. E., Medina, A. C., Serafín, N., Quirarte, G. L., & Prado-Alcalá, R. A. (2008). Acquisition and retention of enhanced active avoidance are unaffected by interference with serotonergic activity. *Behavioural Brain Research*, 195(1), 153-158.
- García-Ruiz, M., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., & Corkidi, G. (1993). Effect of protein malnutrition on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of three ages. *Brain Research*, 625(2), 203-212.
- Garín-Aguilar, M. E., Díaz-Cintra, S., Quirarte, G., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., Prado Alcalá, R. Extinction procedure induces pruning of dendritic spines in CA1 hippocampal field depending on strength of training in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, doi: 10.3389/fnbeh.2012.00012. ISSN: 1662-5153, published: 16 March 2012.
- Gómez, F., Ramos, R., Frenk, S., Cravioto, J., Chávez, R., & Vázquez, J. (1956). Mortality in second and third degree malnutrition. *The Journal of Tropical Pediatrics*, 2, 77-83.
- Granados-Rojas, L., Aguilar, A., & Díaz-Cintra, S. (2004). The mossy fiber system of the hippocampal formation is decreased by chronic and postnatal but not by prenatal protein malnutrition in rats. *Nutritional Neuroscience*, 7(5-6), 301-308.
- Granados-Rojas, L., Larriva-Sahd, J., Cintra, L., Gutiérrez-Ospina, G., Rondan, A., & Díaz-Cintra, S. (2002). Prenatal protein malnutrition decreases mossy fibers-CA3 thorny excrescences asymmetrical synapses in adult rats. *Brain Research*, 933(2), 164-171.
- Griffith, O. W. (1999). Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9-10), 922-935.

- Guthrie, H. A., & Brown, M. L. (1968). Effect of severe undernutrition in early life on growth, brain size and composition in adult rats. *The Journal of Nutrition*, 94(4), 419-426.
- Isaacson, R. L. (2002). Unsolved mysteries: the hippocampus. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 1(2), 87-107.
- Kleiber, N., Chessex, P., Rouleau, T., Nuyt, A.M., Perreault, M., Lavoie, J.C. (2010). Neonatal exposure to oxidants induces later in life a metabolic response associated to a phenotype of energy deficiency in an animal model of total parenteral nutrition. *Pediatr Res*. 68(3),188-192.
- Kehoe, P., Mallinson, K., Bronzino, J., & McCormick, C. M. (2001). Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. *Developmental Brain Research*, 132(1), 23-31.
- Kleim, J. A., Lussnig, E., Schwarz, E. R., Comery, T. A., & Greenough, W. T. (1996). Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning. *The Journal of Neuroscience*, 16(14), 4529-4535.
- Kretchmer, N. (1989). Expression of lactase during development. *American Journal of Human Genetics*, 45(4), 487-488.
- Lanyau, Y. (2009). La dieta en la enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Salud Pública* 35(4), 55-64.
- Leathwood, P. D., & Mauron, J. (1974). Effects of early undernutrition on avoidance learning in mice. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 33(1), 20A-21A.
- León-Jacinto, U. (2008). *Cambios anatómicos en el hipocampo de la rata sometida a dos pruebas de aprendizaje*. Sin publicar, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro.
- Li, J., Wang, H., Stoner, G. D., & Bray, T. M. (2002). Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished mice (1). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 625-633.
- Lukoyanov, N. V., & Andrade, J. P. (2000). Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behavioural Brain Research*, 112(1-2), 85-97.
- Martínez, Y., Díaz-Cintra, S., León-Jacinto, U., Aguilar-Vázquez, A., Medina, A. C., Quirarte, G. L., et al. (2009). Effects of postnatal malnutrition and senescence on learning, long-term memory, and extinction in the rat. *Behavioural Brain Research*, 203(1), 48-53.
- Miñana-Solis, M. C., & Escobar, C. (2008). Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *International Journal of Biological Sciences*, 4(6), 422-432.
- Mokler, D. J., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (2003). Modulation of 5-HT release in the hippocampus of 30-day-old rats exposed in utero to protein malnutrition. *Developmental Brain Research*, 142(2), 203-208.
- Mokler, D. J., Torres, O. I., Galler, J. R., & Morgane, P. J. (2007). Stress-induced changes in extracellular dopamine and serotonin in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of prenatally malnourished rats. *Brain Research*, 1148, 226-233.

- Morgane, P. J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., et al. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(1), 91-128.
- Morgane, P. J., Mokler, D. J., & Galler, J. R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26(4), 471-483.
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Distributed encoding and retrieval of spatial memory in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 18(18), 7535-7542.
- Nerad, L., Ramírez-Amaya, V., Ormsby, C. E., & Bermúdez-Rattoni, F. (1996). Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66(1), 44-50.
- Nuñez, J. L., Koss, W. A., & Juraska, J. M. (2000). Hippocampal anatomy and water maze performance are affected by neonatal cryoanesthesia in rats of both sexes. *Hormones and Behavior*, 37(3), 169-178.
- O'Keefe, J. (1990). A computational theory of the hippocampal cognitive map. *Progress in Brain Research*, 83, 301-312.
- Olivares, R., Montiel, J., & Aboitiz, F. (2001). Species differences and similarities in the fine structure of the mammalian corpus callosum. *Brain, Behavior and Evolution*, 57(2), 98-105.
- Orozco-Solís, R., Matos, R. J., Lopes de Souza, S., Grit, I., Kaeffer, B., Manhaes de Castro, R., et al. (2010). Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *International Journal of Obesity*.
- Palencia, G., Calvillo, M., & Sotelo, J. (1996). Chronic malnutrition caused by a corn-based diet lowers the threshold for pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *Epilepsia*, 37(6), 583-586.
- Passos de Jesus, R., De Nardi, L., Da Rós, N., Salaorni, S., Nagai, M. A., Mitzi Brentani, M., et al. (2010). Amino acids change liver growth factors gene expression in malnourished rats. *Nutrición Hospitalaria*, 25(3), 382-387.
- Prado-Alcalá, R. A. (1991). Fisiología del aprendizaje y la memoria. En G. Ninomiya (Ed.), *Fisiología Humana. I. Neurofisiología* (pp. 492-508). México: Manual Moderno.
- Prado-Alcalá, R. A., & Quirarte, G. L. (2007). La consolidación de la memoria, un siglo después. *Revista de Neurología*, 45(5), 284-292.
- Quiroz, C., Martínez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Díaz-Cintra, S., & Prado-Alcalá, R. A. (2003). Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research*, 153(3), 400-402.
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2001). Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 21(18), 7340-7348.
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M. L., Chao, V., & Bermúdez-Rattoni, F. (1999). Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus*, 9(6), 631-636.

- Rusakov, D. A., Davies, H. A., Harrison, E., Diana, G., Richter-Levin, G., Bliss, T. V., et al. (1997). Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience*, 80(1), 69-77.
- Rusakov, D. A., Richter-Levin, G., Stewart, M. G., & Bliss, T. V. (1997). Reduction in spine density associated with long-term potentiation in the dentate gyrus suggests a spine fusion-and-branching model of potentiation. *Hippocampus*, 7(5), 489-500.
- Salas, M., Díaz, S., & Nieto, A. (1974). Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat. *Brain Research*, 73(1), 139-144.
- Salas M, Torrero C, Regalado M, Loranca A. (1998). The hindlimb hyperextension associated to the urogenital response in newborn underfed rats. *Arch Med Res*. 29(2),125-132.
- Salomons, N.W., & Gross, R. 1995. Urban nutrition in developing countries. *Nutr. Rev.* 53: 90-95.
- Scrimshaw, N. S. (1968). La malnutrición, el aprendizaje y la conducta. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 65(3), 197-209.
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and non declarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13515-13522.
- Tatli, M., Guzel, A., Kizil, G., Kavak, V., Yavuz, M., & Kizil, M. (2007). Comparison of the effects of maternal protein malnutrition and intrauterine growth restriction on redox state of central nervous system in offspring rats. *Brain Research*, 1156, 21-30.
- Torrero, C., Regalado, M., Perez, E., Rubio, L., Salas, M. Neonatal food restriction and binaural ear occlusion interfere with the maturation of cortical motor pyramids in the rat. *Nutr Neurosci*. 2005 Feb;8(1):63-6.
- Valadares, C. T., Fukuda, M. T., Francolin-Silva, A. L., Hernandez, A. S., & Almeida, S. S. (2010). Effects of postnatal protein malnutrition on learning and memory procedures. *Nutritional Neuroscience*, 13(6), 274-282.
- Vicens, P., Carrasco, M. C., & Redolat, R. (2003). Effects of early training and nicotine treatment on the performance of male NMRI mice in the water maze. *Neural Plasticity*, 10(4), 303-317.
- Wang, L., & Xu, R. J. (2007). The effects of perinatal protein malnutrition on spatial learning and memory behaviour and brain-derived neurotrophic factor concentration in the brain tissue in young rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16 Suppl 1, 467-472.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). 2006.
<http://www.insp.mx/ensanut/>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS)
<http://www.who.int/es/>
- Secretaria de Salud Pública SSA. México. 2010
<http://www.ssa.gob.mx>

11. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pesos corporales y cerebrales en tres modelos de malnutrición.	8
Figura 2. Periodos críticos del desarrollo.	10
Figura 3. Células granulares del giro dentado del hipocampo.	11
Figura 4. Número total de sinapsis asimétricas	12
Figura 5. Ejecución en el laberinto acuático de Morris.	16
Figura 6. Fotomicrografías y figuras del área de las fibras musgosas (FM) en el CA3 del hipocampo.	18
Figura 7. Fotografías de camadas de rata control y malnutridas.	22
Figura 8. Fotografías de los tres modelos de malnutrición al destete.	22
Tabla 1. Dietas.	22
Figura 9. Esquema del protocolo de malnutrición.	23
Figura 10. Laberinto acuático de Morris (LAM).	26
Figura 11. Peso logrado por las hembras primíparas durante la gestación.	27
Figura 12. Pesos de las crías de ratas malnutridas (con dieta del 6% de caseína).	28
Figura 13. Apertura palpebral en los grupos M.	29
Figura 14. A, Las medias y errores estándar del cerebro y del hígado en B.	29
Figura 15. A, Las medias y errores estándar de los índices cerebral y hepático.	30
Figura 16. Las medias y errores estándar de los pesos corporales de los 4 grupos experimentales (P23).	31
Figura 17. Las medias y errores estándar del peso corporal.	31
Figura 18. Las medias y errores estándar del peso hepático.	32
Figura 19. Las medias y errores estándar del peso cerebral.	33
Figura 20. Las medias y errores estándar del índice entre el peso del hígado.	34
Figura 21. Las medias y errores estándar del índice entre el peso cerebral.	35
Figura 22. Las medias y \pm errores estándar de los ensayos en cada día (D1-D6)	36
Figura 23. Las medias y errores estándar de pares de ensayos en cada día (D1-6)	37
Figura 24. Adquisición de la Tarea.	38